N° d'ordre 306 Série D.E.

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par

Marguerite WINTZERITH

Technicienne d'Analyses Biologiques
Licenciée-ès-Sciences
Attachée de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique

PREMIÈRE THÈSE

RECHERCHES SUR LA RÉGULATION DE LA BIOSYNTHÈSE DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES DE LA CELLULE HÉPATIQUE AU REPOS ET EN CROISSANCE TUMORALE

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté:

LA MÉLATONINE ET LA SÉROTONINE CHEZ LES ÊTRES VIVANTS

Soutenues le 28 Janvier 1965 devant la Commission d'examen:

MM. J. H. VIVIEN	Président
L. HIRTH	Examinateurs
J. P. EBEL	
P. MANDEL	

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

par

Marguerite WINTZERITH

Technicienne d'Analyses Biologiques
Licenciée-ès-Sciences
Attachée de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique

PREMIÈRE THÈSE

RECHERCHES SUR LA RÉGULATION DE LA BIOSYNTHÈSE DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES DE LA CELLULE HÉPATIQUE AU REPOS ET EN CROISSANCE TUMORALE

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté:

LA MÉLATONINE ET LA SÉROTONINE
CHEZ LES ÊTRES VIVANTS

Soutenues le 28 Janvier 1965 devant la Commission d'examen:

MM.	J. H. VIVIEN	Président
	L. HIRTH	Examinateurs
	J. P. EBEL	
	P. MANDEL	

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

A la mémoire de mon père.

A ma mère
en modeste témoignage de ma filiale affection.

A tous les miens.

A notre Maître,

Monsieur le Professeur MANDEL.

Nous sommes fière de nous compter parmi ses élèves. La constante sollicitude et les encouragements renouvelés de cet éminent maître ont favorablement influencé l'exécution de ce travail. A chaque instant nous avons eu la joie de bénéficier de sa vaste expérience biochimique et de ses conseils éclairés. Son appui matériel et moral et sa bienveillance qu'il nous a prodigués nous ont permis d'estimer ses hautes qualités humaines.

Profondément consciente de tout ce que nous lui devons, nous le prions de trouver ici l'hommage de notre sincère reconnaissance et de notre respectueuse et très vive gratitude.

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Doyen: Professeur G. MILLOT.

Doyens Honoraires: A. DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H. J. MARESQUELLE, J. H. VIVIEN.

Professeurs Honoraires: P. de BEAUCHAMP, L. BOISSELET, L. BOUNOURE, H. CARTAN, G. CERF, Cl. CHABAUTY, A. CHRETIEN, A. DANJON, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, H. GAULT, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P. L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, H. OLLIVIER, Ch. SADRON, E. TERROINE, Y. THIRY, H. VILLAT, H. WEISS, Et. WOLFF, J. YVON.

Maître de Conférences Honoraire: R. WEIL.

Professeurs:

G. HUGEL	T.	Chimie du Pétrole
H. J. MARESQUELLEE	T.	Biologie végétale
A. ROUSSEL	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHE	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE	T.	Astronomie
J. H. VIVIEN	T.	Zoologie et embryologie expérimentale
A. MAILLARD	T.	Physicochimie du pétrole
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.T.P.	Mécanique des Fluides
J. BYE	T.	Chimie minérale et Chimie physique
R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mlle PEREY M.	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T.	Biologie générale
H. BENOIT	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER	T.	Physique génér. et Physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mlle GAGNIEU A.	T.T.P.	Botanique
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	T.T.P.	Chimie biologique
J. BRENET	T.	Electrochimie
G. OURISSON	T.T.P.	Chimie
Cl. LEVI	T.T.P.	Biologie générale
A. COCHE	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF	T.	Physique générale
J. FRENKEL	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG	T.	Physique
J. P. LONCHAMP	T.T.P.	Physique
J. BOSCHER	P.S.C.	Mécanique des Fluides
A. DELUZARCHE	T.T.P.	Chimie
J. B. DONNET	T.T.P.	Chimie physique
R. ARMBRUSTER	T.T.P.	Physique
A. ROCHE	T.T.P.	Physique du Globe
L. HIRTH	T.	Microbiologie
J. YOCCOZ	T.	Physique théorique

A. Sigot	P.S.C.	Zoologie
J. Cogne	T.T.P.	Géologie
A. Fuchs	T.	Mécanique rationnelle
A. Gallmann	P.S.C.	Physique
P. Mialhe	T.T.P.	Physiologie animale
J. P. Ebel	T.	Chimie biologique
J. Parrod	T.T.P.	Chimie
R. Wey	T.T.P.	Chimie
Mme Magnac D.	T.T.P.	Physique
M. Daune	P.S.C.	Physique
J. P. Adloff	P.S.C.	Chimie nucléaire
D. Bernard	T.T.P.	Méthodes Mathématiques de la Physique
G. Lapraz	P.S.C.	Botanique
M. Zisman	T.T.P.	Mathématiques
E. Daniel	P.S.C.	Physique
P. Chevallier	P.S.C.	Physique
J. Gremillard	T.T.P.	Mathématiques
P. Cartier	T.	Mathématiques M.P.C.
G. Reeb	T.	Topologie
F. Norguet	T.	Analyse supérieure
R. Chauvin	T.	Psychophysiologie
J. Wucher	P.S.C.	Physique
Mme Brini M.	P.S.C.	Chimie
G. Perny	P.S.C.	Physique
R. Baro	P.S.C.	Physique
P. Duranton	P.S.C.	Botanique
R. Weiss	P.S.C.	Chimie
P. Federlin	T.T.P.	Chimie

Professeurs associés:

W. Farrahd	Géologie
D. Patterson	Physicochimie macromoléculaire

Maîtres de Conférences:

H. Danan	Physique
J. Leray	Physique
J. P. Schwing	Chimie
M. Sieskind	Physique
G. Monsonego	Physique mathématique
P. Gabriel	Mathématiques
A. Clauss	Chimie
Mme Winter Chr.	Physique
P. A. Meyer	Mathématiques
G. Weill	Physique
J. P. Eberhart	Minéralogie
R. Omnes	Physique théorique
Mme Cagniant D.	Chimie
E. Follenius	Zoologie
J. Lucas	Géologie
X. Fernique	Mathématiques
J. Streith	Chimie
J. Weil	Chimie biologique
M. Demazure	Mathématiques

Maître de Conférences associé:

V. Avanissian	Mathématiques

Secrétaire: G. Saint-Pe.

SOMMAIRE.

ABREVIATIONS. XIV

AVANT-PROPOS. XV

INTRODUCTION GENERALE. 1

METHODES.

A. — ANIMAUX D'EXPERIENCES:

1° Choix des animaux 5
2° Régimes alimentaires utilisés 5

B. — CONDITIONS EXPERIMENTALES:

1° Technique de transplantation de la tumeur 6
2° Technique de séparation des cellules d'ascite 6
3° Technique d'hépatectomie 6
4° Irradiation aux RX 6
5° Administration de la nicotinamide 6
6° Administration de $^{32}PO_4$ 7

C. — DETERMINATION DE CONSTITUANTS DE NUCLEOTIDES ET DES ACIDES NUCLEIQUES:

1° Dosage colorimétrique de l'ion phosphate 7
2° Dosage colorimétrique du désoxyribose 7
3° Dosage colorimétrique du ribose 7
4° Dosages des acides nucléiques 7
5° Détermination de la radioactivité 8

D. — METHODES UTILISEES POUR L'ANALYSE QUALITATIVE DES ARN:

1° Electrophorèse 9
2° Chromatographie sur papier 9
3° Problème de l'absorption propre du papier 9
4° Chromatographie sur colonne de Dowex 1×8 15

E. — TECHNIQUES DE SEPARATION DES NUCLEOTIDES LIBRES:

1° Préparation de l'extrait 15
2° Chromatographie sur colonne des nucléotides libres 15
3° Chromatographie sur papier 16
4° Détermination enzymatique du NAD, NADP, $NADH_2$ et $NADPH_2$ 17

F. — TECHNIQUES PHYSICOCHIMIQUES DE FRACTIONNEMENT DE L'ARN:
1° Chromatographie sur albumine méthylée 17
2° Ultracentrifugation en gradients de saccharose 18
3° Question de l'évaluation des S. 18

G. — ETUDE IN VITRO SUR LES NOYAUX ISOLES:
1° Technique de préparation de noyaux 18
2° Incubation des noyaux isolés in vitro 20

H. — TECHNIQUES DE PREPARATION D'ARN:
1° Préparation d'ARN total 21
2° Préparation d'ARN nucléaire total 22
3° Préparation d'ARN de fractions subnucléaires 22

I. — EXPRESSIONS DES RESULTATS 24

RECHERCHES PERSONNELLES ET DISCUSSION DES RESULTATS.

I. — REGULATION A L'ECHELLE MOLECULAIRE: ETUDE DES NUCLEOTIDES LIBRES DU FOIE NORMAL, DU FOIE EN REGENERATION ET DE L'HEPATOME DE ZAJDELA.
1° Introduction 27
2° Choix des techniques 29
3° Mise au point des conditions d'extraction des nucléotides libres 30
4° Résultats 32
a) Etude qualitative 32
b) Etude quantitative 36
c) Etude de l'incorporation de $^{32}PO_4$ dans les nucléotides adényliques libres de l'hépatome de Zajdela et du foie chez le même animal 40
5° Conclusions 42

II. — REGULATION A L'ECHELLE CELLULAIRE: BIOSYNTHESE DES ARN DU NOYAU DE FOIE ET DE L'HEPATOME DE ZAJDELA.
A. — *Etude comparée de l'ARN nucléaire global du foie et de l'hépatome de Zajdela:*
1 Etude du rapport ARN-ADN du noyau de foie et de l'hépatome de Zajdela 49
2° Constitution de l'ARN nucléaire du foie et de l'hépatome de Zajdela 49
3° Etude de marquage de l'ARN nucléaire par le $^{32}PO_4$ in vivo 50
B. — *Etude des noyaux entiers in vitro:*
1° Incorporation de précurseurs dans l'ARN nucléaire .. 54
2° Migration d'ARN de noyaux incubés in vitro 56
a) Etude quantitative 56
b) Etude qualitative 59
3° Etude de la fraction d'ADN labile 62

C. — *Etude des fractions subnucléaires:*

1° Répartition des acides nucléiques dans les fractions subnucléaires 65

2° Biosynthèse et renouvellement de l'ARN des différents compartiments subnucléaires 68

3° Mise en évidence d'un complexe ARN-ADN dans le compartiment chromosomal du noyau de foie et de l'hépatome de Zajdela 83

4° Comparaison de l'activité spécifique de l'ADN chromosomal et de l'ADN nucléolaire 88

III. — REGULATION A L'ECHELLE TISSULAIRE OU DE L'ORGANISME DE L'ANIMAL:

A. — *Etude quantitative des acides nucléiques et leur renouvellement dans l'hépatome de Zajdela et dans le foie chez le même animal:*

1° Résultats 91

2° Discussion des résultats 92

B. — *Constitution des ARN totaux de foie normal, de l'hépatome de Zajdela et de l'ascite de Novikoff:*

1° Etude comparative de la composition de l'ARN total du foie normal, isolé dans différentes conditions expérimentales 97

2° Etude comparative de la constitution des ARN totaux du foie et de tumeurs 101

C. — *Effet du jeûne protéique sur les acides nucléiques du foie de l'animal porteur de la tumeur et de l'ascite de Zajdela:*

1° Effet de la carence protéique sur le foie de l'animal ascitique 102

2° Effet de la carence protéique sur le développement de l'ascite de Zajdela 105

D. — *Effet de la présence de la tumeur sur les acides nucléiques de quelques tissus de l'organisme hôte:*

1° Effet de la présence de l'hépatome ascitique sur le foie 108

2° Effet de la présence de l'hépatome ascitique sur le pancréas 112

3° Effet de la présence de l'hépatome ascitique sur le rein 115

4° Effet de la présence de l'hépatome ascitique sur les surrénales 115

5° Conclusion 116

RESUME ET CONCLUSIONS 118

BIBLIOGRAPHIE 122

ABREVIATIONS.

ADN:	acide désoxyribonucléique
ARN:	acide ribonucléique
A.S.:	activité spécifique (coups/minute/μg P)
A.S.R.:	activité spécifique relative au phosphate inorganique
AMP: ADP: ATP:	acide adénylique; adénosine mono, di, triphosphate
5dCMP:	acide adénylique à désoxyribose
CMP: CDP: CTP:	acide cytidylique; cytidine, mono, di, triphosphate
GMP: GDP: GTP:	acide guanylique; guanosine mono, di, triphosphate
UMP: UDP: UTP:	acide uridilique; uridine mono, di, triphosphate
IMP:	inosine monophosphate
NAD:	nicotinamide adénine dinucléotide (DPN)
$NADH_2$:	nicotinamide adénine dinucléotide réduit (DPNH)
NADP:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (TPN)
$NADPH_2$:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (TPNH)
FAD:	flavine adénine dinucléotide
TMP: TDP: TTP:	acide thymidylique; thymidine mono, di, triphosphate
UPDAG: UDPG: UDPGa:	uridine disphosphate acétylglucose, glucose, galactose
ADPR:	adénosine diphosphate ribose
ADPRP:	adénosine diphosphate ribose-phosphate
DNAse:	désoxyribonucléase
RNAse:	ribonucléase
DO:	densité optique
g:	accélération de la pesanteur
Exp.:	expérience
Nbre:	nombre
V:	volume
Tris:	hydroxyaminométhane HCl
EDTA:	éthylène diamine tétraacétate
p:	probabilité qu'ont deux moyennes d'être semblables d'après le test de FISCHER. Les moyennes présentent une différence significative si $p \leq 0{,}05$.

AVANT-PROPOS.

Le présent travail a été commencé en novembre 1957 à l'Institut de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine de STRASBOURG et a été achevé fin 1964 au Centre de Recherches Nucléaires à CRONENBOURG, sous la direction de notre Maître Monsieur le Professeur MANDEL et dans l'équipe de recherches de Madame MANDEL, Docteur en médecine, Docteur ès-Sciences, Chef de Travaux de la Faculté de Médecine et Chef de laboratoire au Département des Applications Biologiques du Centre de Recherches Nucléaires à CRONENBOURG. Que Madame MANDEL sache que sa coopération quotidienne empreinte de son dynamisme et de sa bienveillante sympathie ont permis l'aboutissement de ce travail. La cordiale collaboration pendant de nombreuses années, restera notre meilleur souvenir. C'est une grande joie pour nous de lui exprimer ici toute notre gratitude et notre entière amitié.

Nous tenons à assurer de notre profonde reconnaissance Monsieur le Doyen VIVIEN qui nous a toujours réservé un accueil bienveillant et qui a mis à notre disposition des locaux modernes et les moyens matériels de travail qui nous étaient utiles.

Notre plus vive gratitude s'adresse à Monsieur le Professeur EBEL qui est notre parrain depuis notre nomination au CNRS. Il nous a constamment encouragée avec la plus grande compétence. Nous lui en sommes très reconnaissante.

Nous remercions également Monsieur le Professeur HIRTH d'avoir bien voulu nous faire l'honneur d'examiner et de juger le présent travail.

Notre reconnaissance s'adresse à Monsieur BIETH, Ingénieur-Chimiste, Docteur ès-Sciences, Chef de Travaux à la Faculté de Médecine, qui nous a introduit à l'Institut en 1951 et qui nous a donné une excellente formation de technicienne. Il nous a encouragé à poursuivre nos études. Qu'il en soit remercié.

Que le Professeur WEILL et le Docteur CHAMBON, Maître de Conférences Agrégé, veuillent trouver ici l'expression de nos vifs remerciements pour leurs conseils amicaux au cours de notre travail.

La réalisation du présent travail est en grande partie le fruit d'une collaboration étroite avec Madame PÈTE-KLEIN, Licenciée ès-Sciences,

Attachée de Recherches. Elle s'est entièrement associée à la réalisation de notre travail et sa collaboration demeurera pour nous un souvenir durable. Qu'elle trouve ici un témoignage de notre reconnaissance amicale.

Nous tenons à remercier chaleureusement les autres membres de l'équipe de Madame MANDEL : Mademoiselle ITTEL, Licenciée ès-Sciences et Monsieur DREYFUS, Diplômé en Pharmacie, ainsi que les collaborateurs techniques Mademoiselle BOTTLAENDER et Monsieur STAUB, dont le zèle a été au-dessus de tout éloge. Notre gratitude s'adresse à Madame de LAPPARENT-LIPOWSKY, Licenciée ès-Sciences, à Monsieur MICHAELIDES, Docteur-Vétérinaire et à Madame BORKOWSKA, Docteur-Vétérinaire, qui lors de leur passage dans le groupe de recherches de Madame MANDEL, ont contribué à ce travail. Nous ne saurions passer sous silence l'aide précieuse de Madame GUERBERT-DELACHAUX, de Madame HUKENDUBLER-GIGOT, de Monsieur BOLLENDER, de Monsieur DIETRICH et de Monsieur LINGELSER qui ont fait partie au cours des ans, du personnel technique de Madame MANDEL.

Nous exprimons notre reconnaissance amicale à Monsieur GIGOT et à Monsieur PINCK, Docteurs de 3e Cycle, avec lesquels nous partageons quotidiennement l'utilisation des appareils scientifiques.

Notre gratitude va aussi à Madame RUHLAND, Docteur ès-Sciences, ainsi qu'à sa technicienne Madame GANGLOFF, qui nous ont aimablement prêté leur concours pour la réalisation des photographies au microscope.

C'est nous acquitter d'un bien agréable devoir que de remercier Mademoiselle STREICHER et Madame SCHIRRMANN pour les travaux de dactylographie.

Nous sommes heureuse de remercier très cordialement Mademoiselle Noëlle VIRMAUX, Licenciée ès-Sciences, Attachée de Recherches, ainsi que le docteur Monique JACOB, Chargée de Recherches, qui sont devenues nos amies.

Que le personnel de l'Institut de Chimie Biologique et du Département des Applications Biologiques du Centre de Recherches Nucléaires trouvent ici l'expression de notre amicale pensée.

Nous remercions également Madame POUYET, du Centre de Recherches sur les Macromolécules, pour la détermination des constantes de sédimentation à l'ultracentrifugeuse analytique.

Notre plus vive reconnaissance s'adresse au Docteur F. ZADJELA, Maître de Recherches à l'I.N.H., qui a mis gracieusement l'hépatome ascitique à notre disposition.

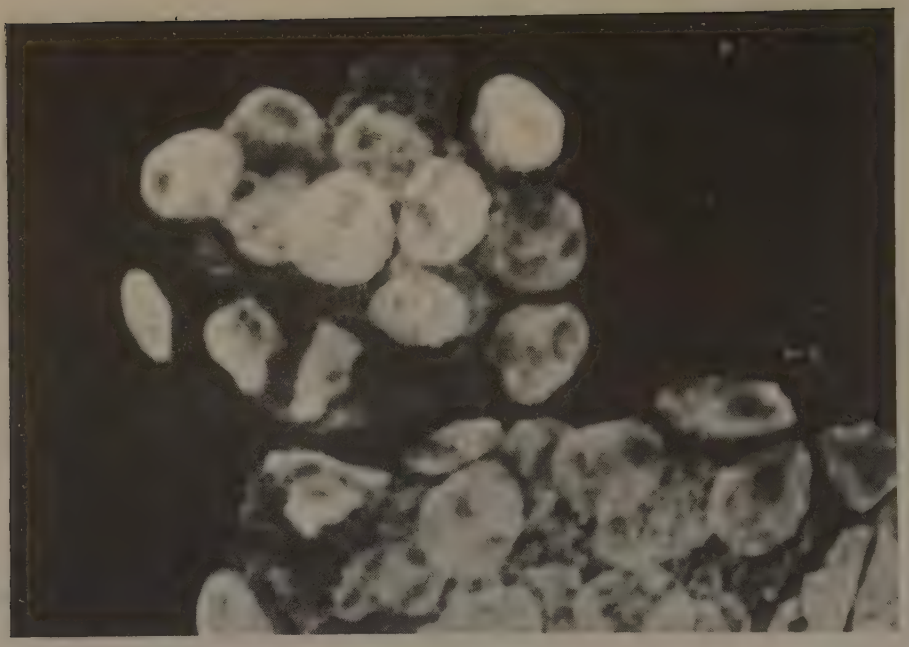
Nous remercions le Centre National de la Recherche Scientifique et le Laboratoire de Recherches de la Clinique Sainte-Anne, qui ont rendu possible ce travail de recherches.

INTRODUCTION GÉNÉRALE.

Parmi les grandes Théories sur l'origine du Cancer qui sont scientifiquement fondées, se classent la Théorie irritative (VIRCHOV), la Théorie embryonnaire (MULLER - PAGET), la Théorie microbienne ou parasitaire (RAPPIN) de la fin du XIX^{e} siècle et les deux Théories du XX^{e} siècle, qui sont les plus importantes: la Théorie mutationniste (BOVERI - STRONG - SUTTON - FARDON) qui a de nombreux adeptes et la Théorie virale qui avait pour défenseurs ardents BORREL et OBERLING. Notons d'ailleurs qu'à l'ère de la Biologie Moléculaire et grâce aux progrès réalisés dans le domaine des Acides Nucléiques, il existe un rapprochement entre la théorie exogène virale et la théorie endogène basée sur la mutation génique.

Toutes ces théories ont été la source de nombreuses recherches sur le Cancer dans des disciplines variées. Mais l'expérience prouve qu'il n'est pas possible de répondre au problème de la genèse du cancer et de trouver un dénominateur commun expliquant l'effet de divers types de tumeurs en abordant la question directement par le biais de ces deux théories. Ceci a conduit aux recherches de biologie sur la Cellule Cancéreuse en analysant les différences de l'équilibre biologique entre les cellules normales et tumorales. Ce fut entre autre Otto WARBURG (390) qui a ainsi découvert la caractéristique biochimique principale de la cellule tumorale. De plus au cours des dernières années, s'est précisée l'idée que la donnée fondamentale indispensable à la connaissance du Cancer est que les recherches de cancérologie doivent définir les traits caractéristiques qui distinguent la croissance tumorale de la croissance normale (41a). C'est dans cette optique que nous avons abordé notre travail.

Il s'agit essentiellement d'une étude biochimique comparée entre la régulation de la biosynthèse des acides nucléiques de la cellule hépatique normale, stationnaire et hautement différenciée, et celle de l'hépatome de ZAJDELA à croissance maligne et seulement partiellement dédifférenciée. Cet hépatome transplantable sous forme ascitique a été obtenue par ZAJDELA après de laborieuses recherches sur le rat de souche Wistar par administration prolongée d'un régime enrichi en jaune de beurre. Les cellules de l'hépatome (voir photographie 1) prolifèrent rapidement sous forme de familles cellulaires en formant des îlots organoïdes, à allure générale de cellules hépatiques.



Photographie 1

Cellules de l'hépatome de Zajdela observées à l'immersion après fixation et coloration au MAY-GRUNWALD. (Grossissement 800 environ).

Soulignons que cet hépatome constitue un matériel expérimental particulièrement précieux et favorable pour effectuer une comparaison valable avec le foie normal. En effet, il présente l'avantage d'être une culture de cellules particulièrement homogène. L'étude microscopique révèle que les noyaux de cellules d'un même îlot sont caryométriquement très proches les uns des autres. L'hépatome de ZAJDELA ne renferme donc pas, comme c'est le cas des hépatomes solides, de parties saines à côté d'autres parties plus ou moins nécrosées qui sont du point de vue biochimique très hétérogènes.

Les connaissances actuelles en biochimie sur la biosynthèse de l'acide ribonucléique (ARN) des bactéries sont suffisamment avancées pour aborder l'étude au niveau des cellules supérieures. Dès lors se pose le problème des compartiments cellulaires et en particulier celui de la corrélation entre le noyau et le cytoplasme cellulaire. Nous nous sommes intéressés à l'aspect quantitatif et qualitatif de la question.

En premier lieu nous avons abordé un point de vue de la régulation de la biosynthèse d'ARN à l'échelle moléculaire en étudiant l'ajustement du pool de nucléotides libres, en particulier du NAD et NADP. Dans une deuxième étape nous avons envisagé la biosynthèse

d'ARN à l'échelle moléculaire et cellulaire en analysant la répartition des différentes fractions d'ARN dans les compartiments nucléaires. Ce travail avait pour but de déceler les différences éventuelles entre les cellules au repos et normales et celles en croissance tumorale. Nous nous sommes intéressés au renouvellement des différentes fractions d'ARN nucléaires en vue de préciser les «sites» initiaux de la synthèse d'ARN. En étudiant l'ARN lié à l'ADN chromosomique nous avons mis en évidence un hybride ARN-ADN naturel. Par ailleurs nous avons trouvé une fraction ADN dans la fraction nucléolaire qui a un renouvellement particulièrement intense et dont l'importance biologique reste à préciser. Nous avons rapproché de ces faits l'étude de l'ARN quittant le noyau, lors de l'incubation in vitro, effectuée avec l'objectif de définir l'ARN rapidement synthétisé et quittant le noyau; celui-ci peut être considéré comme fraction passant dans le cytoplasme.

Après les points de vue moléculaire ou cellulaire nous avons voulu analyser dans une troisième étape quelques facteurs de régulation de la biosynthèse d'ARN à l'échelle de l'organe de l'animal. Notre travail préliminaire a consisté à comparer la richesse et le renouvellement des acides nucléiques des deux types de tissus. Puis nous nous sommes intéressés d'une part à l'influence de l'apport protéique et d'autre part à l'effet de la néosynthèse de NAD induite par injection de nicotinamide, sur le métabolisme de l'ARN. Enfin nous avons étudié l'influence de la présence de la tumeur sur le métabolisme nucléique des organes de l'hôte, ce qui constitue un problème très important pour la pathologie du Cancer.

Nous exposerons d'abord les méthodes connues que nous avons adoptées pour notre travail. Certaines techniques qui ont fait l'objet de mise au point personnelle figurent dans le chapître des recherches personnelles. Afin d'éviter les redites, la partie bibliographique sera traitée avec la discussion des résultats personnels. Parmi les résultats que nous avons obtenus, certains ont été trouvés simultanément dans d'autres laboratoires. C'est là un phénomène quasiment inévitable à l'heure actuelle dans la recherche concernant les acides nucléiques.

MÉTHODES.

A. — *Animaux d'expériences.*

1° CHOIX DES ANIMAUX.

Nos expériences ont toutes porté sur le Rat blanc de souche WISTAR, élevé soit dans notre laboratoire, soit dans l'élevage d'animaux de la Maison METZ d'OBERBRONN (Bas-Rhin). Cette souche est génétiquement très homogène, vu les croisements répétés entre individus d'une même portée de génération en génération.

Dans les essais portant sur des études comparatives, nous avons pris des animaux de la même portée, de même sexe, adultes et de poids corporel moyen de 180 g à 200 g.

2° REGIMES ALIMENTAIRES UTILISES.

En dehors des expériences sur le jeûne protéique tous les animaux recevaient une nourriture standard qui contenait 17% de matières protéiques, 3% de matières grasses, 55% d'amidon et 13% d'eau. Le régime des rats soumis au jeûne protéique comporte pour 1 kg: 625 g d'amidon de blé ou de maïs, 200 g de sucre fin, 100 g de saindoux, 40 g de sciure de bois traitée et 35 g de mélange salin selon TERROINE (378).

L'apport vitaminique est fourni par une solution polyvitaminée d'Hydrosol de la Maison ROCHE. Cette solution contient par ml: 2500 U.I de vitamine A, 1 mg de vitamine B_1, 0,75 mg de vitamine B_2, 2,50 mg de nicotinamide, 1 mg de vitamine B_6, 500 U.I de vitamine D, 2 mg de panthénol, 25 mg de vitamine C, et 1 mg de vitamine E.

B. — *Conditions expérimentales.*

1° TECHNIQUE DE TRANSPLANTATION DE LA TUMEUR.

La transplantion de la tumeur se fait sous une lampe germicide à ultra-violets. Le prélèvement du liquide d'ascite et sa réinoculation intrapéritonéale à des rats s'effectuaient dans des conditions de stérilité rigoureuse. Le volume d'ascite injecté était de 1 ml. Une ascite abondante contenant une quantité importante de cellules se développait en cinq à six jours.

2° TECHNIQUE DE SEPARATION DES CELLULES D'ASCITE.

Le liquide ascitique est recueilli sur 2 ou 3 gouttes d'héparine ou de solution d'oxalate d'ammonium M/10. Les cellules sont séparées par centrifugation à 150 g environ («International P.R.2.» tête horizontale, n° 297 à 250 tours par minute). Après une première centrifugation de 10 minutes, on décante le surnageant riche en hématies. Le culot de cellules est lavé avec une solution de chlorure de sodium à 9‰ contenant 1 g de glucose, 76 mg d'acide pyruvique et 4 mg d'acide succinique. On recommence 3 ou 4 fois le lavage jusqu'à ce que l'on obtienne des cellules entièrement dépourvues de globules rouges. Nous avons adopté le lavage en présence de substrats d'oxydation qui assurent le maintien du métabolisme cellulaire pendant les manipulations préparatoires. Toutes les manipulations sont effectuées à 0°.

3° TECHNIQUE D'HEPATECTOMIE.

Pour les expériences sur le foie en régénération nous opérons sur des rats ayant subi une hépatectomie partielle 17 heures avant le sacrifice, selon la technique de Higgins et Anderson (168).

4° IRRADIATION AUX RX.

Pour les expériences sur les nucléotides de l'hépatome de Zajdela après action des RX, les rats porteurs de la tumeur sont irradiés totalement par une dose unique de 700 r, 12 heures avant le sacrifice.

5° ADMINISTRATION DE LA NICOTINAMIDE.

La vitamine PP (Hofmann-Laroche) est administrée par voie sous-cutanée en solution dans du sérum physiologique, sous un très faible volume.

Dans les essais sur l'influence d'une injection de nicotinamide sur les pyrimidine nucléotides du foie et de l'hépatome de Zajdela, les rats ont reçu une injection unique de nicotinamide 8 heures avant le sacrifice, à raison de 50 mg de vitamine pour 100 g de poids corporel.

Pour les expériences sur l'effet d'une néosynthèse de NAD_2 induite in vivo, sur le métabolisme de l'ARN du foie et de l'hépatome de Zajdela, les animaux ont reçu deux fois par jour 100 mg de nicotinamide par 100 g de poids corporel pendant cinq jours.

6° ADMINISTRATION DE $^{32}PO_4'''$.

Le $^{32}PO_4'''$ a été injecté par voie intramusculaire sauf pour les études concernant l'ARN nucléaire où on a préféré administrer l'isotope par voie intrapéritonéale.

En général, nous utilisons le $^{32}PO_4'''$ à dose de 100 μC pour 100 g de poids corporel, excepté dans les expériences sur les nucléotides libres où on a injecté la double dose d'isotope. Pour les études de l'ARN nucléaire les animaux ont reçu 300 μc par 100 g de poids corporel.

C. — *Détermination des constituants de nucléotides et des acides nucléiques.*

1° DOSAGE COLORIMETRIQUE DE L'ION PHOSPHATE.

Nous utilisons la technique de Briggs (42) modifiée par Machebœuf et Delsal (240) pour les quantités de phosphore comprises entre 10 et 80 μg par prise d'essai. Pour des quantités de phosphore plus faibles de 3 μg à 20 μg nous utilisons soit la technique de Chen (77), comportant une minéralisation perchlorosulfurique et utilisant pour la colorimétrie la vitamine C comme réducteur, soit la technique de Berenblum et Chain (22), adoptée par Delsal et Manhouri (94). Dans ce dernier cas on procède à l'extraction chromogène par un faible volume de n-Butanol permettant l'obtention d'une couleur plus intense.

2° DOSAGE COLORIMETRIQUE DU DESOXYRIBOSE.

Le D.2. désoxyribose est dosé par la méthode de Dische (98) avec la modification de Burton (51) qui rend la réaction à la diphénylamine plus sensible et plus spécifique.

3° DOSAGE COLORIMETRIQUE DU RIBOSE.

Le D. ribose est déterminé selon la technique de Mejbaum (267-268) basée sur la réaction de Bial.

4° DOSAGES DES ACIDES NUCLEIQUES.

Immédiatement après le sacrifice de l'animal, les organes prélevés sont refroidis à 0°, puis pesés rapidement et soumis à l'extraction de l'acido-soluble successivement par l'acide trichloracétique à 10% (une fois), par l'acide trichloracétique à 7% (trois fois). Le résidu, séparé par centrifugation à 0°, est lavé d'abord à l'eau distillée froide, puis trois fois à l'alcool à 95% froid. On procède ensuite à l'extraction des lipides: pour de faibles quantités de matériel on extrait trois fois 15 minutes à l'alcool bouillant, puis trois fois à l'éther sulfurique à 37°. Quand on opère sur de grandes quantités, on délipide soit à l'appareil de Kumagawa avec l'alcool bouillant pendant 8 heures puis à l'éther bouillant pendant 3 heures, soit avec le mélange méthanol-chloroforme selon Folch (115), suivi d'une extraction à l'éther chaud.

Le culot délipidé renfermant les acides nucléiques est séché à l'air et pesé.

Le dosage des acides ribonucléiques et des acides désoxyribonucléiques est basé sur le principe de la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER (332) avec quelques modifications: hydrolyse par la potasse N/2, et séparation par précipitation à l'acide perchlorique de la fraction désoxyribonucléique insoluble de la fraction ribonucléique soluble. L'ion perchlorique est ensuite éliminé par la potasse à froid.

L'ARN est déterminé dans la fraction ribonucléique soluble par le dosage de ribose, par celui du phosphore et par l'absorption dans l'ultra-violet après fixation sur charbon (87) et élution par un mélange d'alcool à 95°, d'ammoniaque à 20% et d'eau (57) (5v-1v-4v). Par ce procédé d'élution nous récupérons en général entre 90% et 95% du matériel adsorbé. Nous employons soit du charbon ACTIVIT XL, soit du charbon BARNEBEY-CHENEY (15). Signalons que tous les lots de ces deux sortes de charbon ne peuvent pas être utilisés, vu parfois la présence d'impuretés, rendant toute détermination quantitative sans valeur. L'Activit est traitée par l'acide acétique 50% bouillant pendant 5 minutes et s'il y a lieu il est désactivé par le phénol. Le charbon Barnebey-Cheney est traité par l'acide chlorhydrique normal, puis successivement par du complexon à 2,5% à pH 7 et de l'alcool octylique III à 8% dans l'éthanol ~~séparé~~ *tutur*, par d'abondants lavages à l'eau distillée.

La fraction de l'hydrolysat alcalin contenant l'ADN est extrait avec de l'acide perchlorique en vue de la détermination de l'ADN par le désoxyribose et par le phosphore.

5° DETERMINATION DE LA RADIOACTIVITE.

L'activité spécifique du $^{32}PO_4'''$ a été déterminé après précipitation sous forme de phosphate ammoniaco-magnésien selon SACKS (325). L'activité des nucléotides libres et celles de l'ARN ont été déterminées sur l'éluat après adsorption sur colonne de charbon. L'activité spécifique de l'ADN est mesurée après deux redissolutions et reprécipitations successives par la soude et l'acide perchlorique. Ceci permet d'éliminer la contamination par l'ARN. Comme les différences entre AS de l'ARN et AS de l'ADN sont particulièrement importantes, la fraction contenant les oligonucléotides de l'ADN a été traitée par la ribonucléase et le résidu insoluble de ce traitement par la DNAse. L'AS de l'ADN est alors déterminée sur le produit d'hydrolyse de la DNAse.

Pour la détermination de la radioactivité du ^{32}P, nous avons utilisé un compteur cloche à fenêtre mince (1,6 — 2 mg/cm^2) monté sur un système Philipps. La mesure se fait en couche épaisse. Pour les activités faibles nous comptons dans un spectromètre à scintillateur liquide Packard.

Pour les détails de ces techniques on les trouvera entre autre dans les thèses de doctorat de J.-D. WEILL (394), R. ROSENBERG (323), J. RODESCH (322), M. SENSENBRENNER (352).

D. — *Méthodes utilisées pour l'analyse qualitative des ARN.*

La solution contenant les ribonucléotides, après hydrolyse potassique de l'ARN et après élimination de l'ion K+ par l'acide perchlorique est soit lyophilisée directement, soit lyophilisée après adsorption et élution sur colonne de charbon, reprise par un faible volume d'acide chlorhydrique N/10 et séparée par une des trois techniques ci-après.

1° ELECTROPHORESE.

L'électrophorèse est effectuée sur le phérographe (livré par HORMUTH-VETTER, HEIDELBERG-WIESLOCH, Allemagne) d'après WIELAND et PFEIDERER (401) sous une tension 2.700 volts, pendant 2 heures, dans un tampon acétate de lithium — acide acétique à pH 3,4 (40 ml d'acétate de lithium 0,1 M avec 960 ml d'acide acétique 0,1 M) avec environ 50 µg de phosphore ribonucléique à séparer. Les nucléotides sont repérés avec une lampe à ultra-violet: short-wave ultra-violet Minéral-light modèle SL 2537. La localisation des taches est facilitée par l'emploi d'un papier fluorescent au phosphosilicate de zinc selon TSUBOI et PRICE (381). Les taches découpées sont éluées avec l'acide chlorhydrique N/10 et leur absorption aux ultra-violets est déterminée au spectrophotomètre (JOBIN-YVON) aux différentes longueurs d'onde caractéristiques des ribonucléotides: 250 m µ, 260 m µ, 275 m µ et 280 m µ.

2° CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

Les chromatographies sur papier ont été effectuées selon les techniques décrites dans le chapitre des nucléotides libres.

3° PROBLEME DE L'ABSORPTION PROPRE DU PAPIER.

Dans l'estimation de la répartition des ribonucléotides d'après les données spectrophotométriques, notre attention a été retenue comme celle d'autres auteurs, par la cause d'erreur qu'introduit l'absorption propre du papier. Bien que le problème de l'absorption propre du papier, en électrophorèse et en chromatographie sur papier, ait été étudié par de nombreux chercheurs: MAGASANIK et CHARGAFF (241), DAVIDSON (91 - 92), GROSBIE (153), MARKHAM (255), HOTCHKISS (180), GOLD (135), FLECKENSTEIN (114), ROSENBERG (323), BUSCH (52) et collaborateurs, il nous a paru nécessaire de réexaminer le problème dans nos conditions expérimentales, afin de trouver une méthode pour évaluer les données spectrophotométriques sans que la répartition des ribonucléotides des ARN soit entachée d'erreurs de par les substances absorbantes du papier.

Nous avons déterminé l'absorption aux U.V. du papier que nous utilisons (Schleicher et Schüll N° 2043). A cet effet nous avons procédé à des électrophorèses sans déposer des échantillons de nucléotides. Le papier a été séché, découpé en bandes successives parallèles à la ligne de départ, sur laquelle on dépose normalement le matériel à séparer et allant de la région cathodique à la région anodique. Le papier découpé est immergé après réduction en fragments plus petits dans l'acide chlorhydrique N/10, afin de recueillir les produits éventuellement élués. Notons que nous n'avons pas employé la technique de ROSENBERG (323) pour l'évaluation de l'absorption propre du papier. Cette méthode nous a paru plus longue et elle introduit une source d'erreur supplémentaire, étant donné qu'il faut déterminer en plus le poids de chaque spot de nucléotide pour le calcul de l'absorption propre du papier.

Nos résultats sont consignés dans les tableaux 1 et 2. Il en ressort que le papier absorbe plus dans la région anodique que dans la zone de la cathode. Il y a donc lieu de tenir compte de cette différence d'absorption en fonction de la localisation des nucléotides, lors de la soustraction des D.O. due au papier. Rappelons que FLECKENSTEIN (114) a déjà noté que la quantité de P due au papier augmentait avec la distance de la tache à la ligne de départ. Il y a 95% de chances que l'absorption propre du papier à 260 mμ, pour une tache donnée soit 0,085 ± 0,034, c'est-à-dire comprise 0,119 D.O. et 0,051 D.O., dans la zone cathodique; dans la zone anodique l'absorption du papier seul est dans les mêmes conditions de 0,122 D.O. ± 0,60 soit comprise entre 0,182 D.O. et 0,062 D.O. Mais la différence de l'absorption propre du papier à 260 mμ pour une tache donnée est seulement de 0,026 D.O. ± 0,02, c'est-à-dire comprise entre 0,046 D.O. et 0,06 D.O. On comprend aisément l'importance de l'absorption propre du papier quand celui du spot élué est de 0,3 à 0,4 D.O. par exemple. Mais même pour des densités optiques plus élevées de l'ordre de 0,8 à 0,9 D.O. l'absorption du blanc de papier peut être une cause d'erreur importante.

L'examen du tableau 2 montre que la différence d'absorption du papier à deux longueurs d'onde, à différentes distances de la ligne de départ est relativement faible. Ainsi en évaluant les résultats d'après la différence de D.O. à deux longueurs d'onde 260 et 280 mμ l'erreur relative sera nettement plus faible que si l'on tient compte de la mesure à une seule longueur d'onde, par exemple 260 mμ. Cependant la différence d'absorption entre deux longueurs d'onde peut varier du simple au double suivant les longueurs d'onde choisies: entre 260 mμ et 290 mμ on trouve 0,044 et entre 260 et de 275, 0,018. De même les oscillations autour de la moyenne peuvent être plus ou moins accusées. Les valeurs de l'exemple de séparation électrophorétique figurant dans le tableau (3) illustre ces remarques. Si on corrige les valeurs des spots mesurés à deux longueurs d'onde par les chiffres

TABLEAU 1

ABSORPTION PROPRE DU PAPIER D'ELECTROPHORESE DANS L'UV. à 260 mμ.

région de l'électrophérogramme où le papier a été analysé.	nombre de déterminations	D. O. par tache à 260 mμ
région cathodique	50	0,085 ± 0,017
région anodique	46	0,122 ± 0,030

Les valeurs représentent les moyennes expérimentales suivies de l'écart standard.
~~Les valeurs représentent les moyennes suivies de l'écart standard~~

TABLEAU 2

ETUDE DE LA DIFFERENCE D'ABSORPTION DU PAPIER D'ELECTROPHORESE DANS L'UV.

nombre de déterminations.	D. O. à 260 mμ -D.O. à 240 mμ	D. O. à 260 mμ -D. O. à 275 mμ	D. O. à 260 mμ -D. O. à 280 mμ	D. O. à 260 mμ -D. O. à 290 mμ
164	0,025 ± 0,020	0,018 ± 0,007	0,026 ± 0,010	0,044 ± 0,020

Les résultats figurent les différences de D. O. par tache aux deux longueurs d'ondes étudiées.
Les valeurs représentent les moyennes expérimentales suivies de l'écart standard.

TABLEAU 3

EXEMPLE D'ELECTROPHEROGRAMME D'ARN MONTRANT L'IMPORTANCE DE L'ABSORPTION PROPRE DU PAPIER. Cette dernière est exprimée en % de la D. O. totale (D. O. du nucléotide élué + D. O. du papier). Pour le CMP nous avons calculé la différence de la D. O. à 280 mμ et de celle à 260 mμ.

nucléotide séparé	zône de localisation	D. O. par ml d'éluat			Evaluation d'après D. O. à 260 mμ		Eval. d'après D. O. 260 mμ - D. O. 280 mμ	
					importance relative de l'absorption propre du papier Limites :			
		260 mμ	280 mμ	$\frac{260\ m\mu}{280\ m\mu}$	inférieure	supérieure	inférieure	supérieure
CMP	cathodique	0,815	1,355	0,540	6,3%	14,6%	1,1%	8,5%
AMP	cathodique	0,880	0,220	0,660	5,8%	13,5%	0,9%	7 %
GMP	anodique	0,990	0,675	0,315	6,3%	18,4%	1,9%	14,6%
UMP	anodique	0,660	0,230	0,430	9,4%	27,6%	1,4%	10,7%

TABLEAU 4

DOSAGE DU PHOSPHORE CONTENU DAS LE PAPIER D'ELECTROPHORESE.

	Nombre de déterminations	μg P par tache
papier élué à l'acide chlorhydrique N/10	63	1,15 μg ± 0,66
papier incinéré correspondant à 52 taches, puis minéralisé		0,65 μg

les plus élevés obtenus statistiquement pour l'évaluation du blanc du papier aux mêmes longueurs d'onde, l'erreur maximum est de 7 à 14,6%. Si on déduit la valeur la plus faible, la correction est de 0,9 à 1,5%. Par contre on voit aisément que si on déduit d'une façon systématique la valeur du blanc de papier de la lecture à une longueur d'onde 260 mμ par exemple, la D.O. due aux matières absorbantes du papier peut atteindre des proportions importantes de 13,5% à 27,6% dans la limite supérieure, la limite inférieure atteint 5,8 à 9,4%.

TABLEAU 5

COMPOSITION D'UN MELANGE DE MARQUEURS D'APRES DIFFERENTS MODES D'EXPRESSION DES RESULTATS

	CMP	AMP	GMP	UMP
Référence	33,3	21,2	26,5	19,0
P dosé	32,2 ± 2,2 (-)	23,3 ± 1,6 (+)	25,6 ± 1,8 (-)	18,9 ± 1,0 (-)
P après correction due au papier	33,4 ± 1,8 (-)	23,4 ± 1,5 (+)	26,0 ± 1,6 (-)	18,5 ± 1,2 (-)
D. O. à 260 mu sans correction due au papier	32,9 ± 1,7 (-)	21,2 ± 1,7 (-)	26,6 ± 1,1 (-)	19,3 ± 1,0 (-)
D. O. à 260 mu avec correction dûe au papier	34,7 ± 0,2 (++)	21,4 ± 0,3 (-)	25,7 ± 0,8 (+)	18,2 ± 1,6 (-)
Différence de D. O. à 260 mu et à 280 mu sans correction dûe au papier	32,6 ± 1,4 (-)	21,7 ± 0,8 (-)	26,9 ± 1,1 (-)	18,8 ± 1,1 (-)
Différence de D. O. à 260 mu et à 280 mu avec correction dûe au papier	33,3 (-)	22,3 ± 1,0 (-)	25,4 ± 1,1 (-)	18,9 ± 1,0 (-)
CHARGAFF (241)	30,8 ± 1,5 (++)	27,6 ± 1,5 (++)	18,8 ± 1,0 (++)	22,8 ± 1,0 (++)
BUSCH (52)	37,2 ± 4,1 (++)	0 (++)	45,2 ± 1,3 (++)	17,6 ± 2,4 (++)
BUSCH modifié	18,3 ± 2,4 (++)	31,5 ± 1,5 (++)	22,7 ± 1,6 (++)	27,5 ± 1,8 (++)

Les chiffres indiquent le nombre moyen de micromoles (d'après 9 déterminations) de chaque nucléotide pour 100 micromoles du mélange des quatre nucléotides. La moyenne est suivie de la déviation standard précédée du signe ±. Dans chaque case nous avons figuré le résultat du test t de FISCHER: le signe (-) correspond à une différence non significative ($p > 0,05$), le signe (+) à une différence significative ($p < 0,05$), le signe (++) à une différence hautement significative ($p < 0,01$).

Il convenait de se demander de quel ordre de grandeur est l'erreur possible dûe au papier dans le dosage de phosphore. Pour cela nous avons déterminé d'une part le Phosphore sur les éluats de taches individuelles de papier en procédant à un enrichissement connu de PO_4''' minéral, d'autre part sur du papier incinéré. Nos résultats sont inscrits dans le tableau 4. Nous voyons que la quantité de µg P par tache est appréciable, quoique relativement faible, si on rapporte à la quantité de Phosphore nucléotidique élué qui est de 10 µgP par spot. Il en résulte que les quantités de Phosphore à séparer ne doivent pas être trop faibles et il y a lieu de faire la correction sinon les valeurs obtenues par le dosage de Phosphore sont entachées de grandes erreurs.

Pour déterminer simultanément les erreurs éventuelles causées par les mesures d'absorption dans les U.V. et du Phosphore contenu dans le papier, nous avons procédé à une séparation d'un mélange de marqueurs contenant les quatre ribonucléosides monophosphates 2' — 3' (Produits Schwarz U.S.A.). Nous avons évalué la constitution de ce mélange après séparation électrophorétique d'après le phosphore dosé et les données spectrophotométriques en tenant compte de l'absorption propre du papier selon les méthodes proposées par divers auteurs.

Le tableau 5 fait état de nos résultats. La composition initiale de référence figure dans la première ligne horizontale. La répartition évaluée d'après le Phosphore dosé sur l'éluat de l'électrophérogramme avec et sans correction due au papier fournit des valeurs très proches de celle de la répartition dite de référence, sauf pour l'AMP où le phosphore provenant du papier semble jouer un rôle. Si nous comparons la composition calculée d'après les données spectrophotométriques, nous voyons que nous trouvons des différences significatives avec le mélange initial quand on emploie les méthodes préconisées par Chargaff (241) et Busch (52) et autres.

Dans cette première technique on utilise les D.O. des éluats à deux longueurs d'onde différentes: la longueur d'onde correspondant à l'absorption maximum du nucléotide et la longueur d'onde de 290 mµ o ùl'absorption du nucléotide est faible. Dans ce cas les nucléotides ont été évalués d'après la formule µg de P par ml:

$$1000 \frac{(\text{D. O. à } \lambda \text{ maximum} - \text{D.O. à } 260 \text{ m}\mu)}{\Delta \text{ k maximum}}$$

Δ k maximum = différence entre l'extinction spécifique à la longueur d'onde d'absorption minima et à 290 mµ; l'extinction spécifique $k = \frac{\text{D.O. mesurée}}{c \times l}$ où «c» est la concentration en g par litre et «l» l'épaisseur de la cuve en cm.

La méthode préconisée par Busch, séduisante à priori, permettant de calculer l'absorption propre du papier pour chaque tache sans mesure directe grâce à la formule:

$$Y = \frac{\text{k nucléotidique (D.O. 260 m}\mu - \text{D.O. 240 m}\mu)}{\text{k nucléotidique} - \text{k papier}}$$

pour l'AMP, le GMP et l'UMP; la formule devient pour le GMP:

$$Y = \frac{\text{k nucléotidique (D.O. à 260} - \text{D.O. à 280 m}\mu)}{\text{k nucléotidique} - \text{k papier}}$$

en posant que pour un nucléotide donné:

$$\frac{\text{D.O. à 260 m}\mu - y}{\text{D.O. à 240 m}\mu - x} = \text{k nucléotidique} \quad \text{et} \quad \frac{y}{x} = \text{k papier}$$

x et y étant l'absorption propre du papier de la tache à 240 mμ et 260 mμ.

Nous avons essayé d'adapter la méthode de Busch en tenant compte des longueurs d'onde pour lesquelles l'erreur relative des lectures est plus faible en utilisant les longueurs 260 mμ et 280 mμ pour le CMP, l'AMP et l'UMP et celles de 240 mμ et 260 mμ pour le GMP par opposition aux D.O. des longueurs d'onde à 240 mμ et 260 mμ pour l'AMP, le GMP et l'UMP et celles de 280 mμ et 260 mμ pour le CMP dans la technique originale. Mais dans la méthode originale de Busch comme dans la variante qui l'améliore, les écarts par rapport aux valeurs initiales sont hautement significatifs. Notons que pour la répartition évaluée d'après Busch, on trouve une valeur nulle pour un des nucléotides. La méthode de calcul basée sur la différence d'absorption à deux longueurs d'onde 260 mμ et 280 mμ diminuée de la D.O. aux mêmes longueurs d'onde de taches de papier vierge, de même aire que la tache du nucléotide et situé au même niveau sur l'électrogramme, conduit aussi à des répartitions significativement différentes. (Dans ce cas une différence d'absorption aux U.V. de une unité D.O. à 280 et 260 mμ correspond à 5,28 μg de P pour le CMP et une différence d'une unité D.O. à 260 mμ et 280 mμ respectivement à 2,72 μg P, à 8,64 μg P et à 4,48 μg P pour l'AMP, le GMP et l'UMP.) Seules les méthodes simples qui ne tiennent pas compte de l'absorption propre du papier: l'une basée sur la D.O. mesurée à 260 mμ et l'autre fondée sur la différence d'absorption à deux longueurs d'onde 260 mμ et 280 mμ donnent une répartition satisfaisante avec la composition centésimale du mélange de marqueurs de référence.

Compte tenu de l'ensemble des données que nous venons d'examiner, nous avons évalué par la suite la constitution des ARN d'après le P dosé d'une part et d'après la différence de D.O. à 260 mμ et à 280 mμ d'autre part, nos valeurs correspondent à la moyenne d'après ces deux modes d'expression de résultats.

4 ° CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE DOWEX 1 × 8.

Pour l'étude de la répartition des nucléotides de l'ARN nucléaire total nous avons utilisé de très petites colonnes de résine Dowex 1 × 8. La résine est traitée comme il a été décrit ailleurs. On l'utilise sous forme HCOO—. Les colonnes employées ont un diamètre intérieur de 0,6 cm et une hauteur de résine de 2,5 cm. On absorbe environ 50 µ g P nucléotidique dans un volume de 0,1 ml. L'élution se fait par les gradients discontinus de Cohn (84).

35 ml	acide formique	0,02 M ..	CMP
45 ml	acide formique	0,15 M ..	AMP
50 ml	acide formique	0,01 M }	UMP
	formiate de sodium	0,05 M }	
70 ml	acide formique	0,1 M }	GMP
	formiate de sodium	0,1 M }	

E. — *Techniques de séparation des nucléotides libres.*

Nous utilisons la technique de Cohn (82 - 83) modifiée par Hurlbert (183) et Klethi (213) employée couramment dans notre laboratoire.

1° PREPARATION DE L'EXTRAIT.

Après homogénéisation de l'organe dans un appareil de Potter-Elvejehm (305) en téflon, les nucléotides libres sont extraits par traitement successif à l'acide perchlorique 0,6N et 0,2N. L'acidosoluble est immédiatement neutralisé à la potasse et le perchlorate de potassium éliminé. Dans les expériences utilisant le $^{32}PO_4'''$, on prend une partie aliquote en vue de la précipitation du P minéral pour la détermination de son activité spécifique. On concentre l'extrait acidosoluble contenant les nucléotides libres par lyophilisation.

2° CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DES NUCLEOTIDES LIBRES.

Nous avons utilisé la résine échangeuse d'anion: Dowex 1 × 8 de 200 à 400 mailles, sous forme formiate; les colonnes utilisées ont 0,8 cm de diamètre et 20 ou 30 cm de hauteur. La solution contenant les nucléotides libres est adsorbée sur colonne sous un volume de

10 ml environ; après lavage abondant à l'eau distillée l'effluent de la colonne a une D.O par ml de 0,05 à 260 m μ. On procède à l'élution par le système de gradients acides formique — formiate d'ammonium. Nous utilisons une chambre de mélange de 570 ml contenant initialement de l'eau bidistillée. Nous éluons d'abord avec l'acide formique 0,5N jusqu'à la sortie du CMP et du NAD et l'AMP, puis avec l'acide formique 4N pour les nucléotides GMP — TPN — IMP — UMP, ensuite avec le mélange acide formique 4N — formiate 0,2N pour l'ADP et les uridines à coenzymes, finalement à l'acide formique 4N — formiate 0,8N. La vitesse d'écoulement est de 3 minutes par fraction de 4 ml. L'absorption de l'éluat de la colonne est déterminée à 260 m μ et à 280 m μ. Les données spectrophotométriques renseignent quant à la nature du nucléotide élué compte tenu des caractéristiques spectrales des nucléotides de la littérature (73) d'après les travaux de Bock (32) pour les nucléotides de l'adénine, de la guanine, de l'uracile et de la cytosine, de Colowick (85) pour le NAD et NADP et ceux de Johnson (193), Kalckar (194) et Volkin (387) pour l'inosine monophosphate. Pour évaluer quantitativement les nucléotides nous avons adopté les coefficients d'extinction moléculaires des nucléotides à 260 m μ de Bock (32) et de Colowick (85). Les pics obtenus dans les diagrammes, traçant les D. O à 260 m μ en fonction des fractions éluées, indiquent des ensembles de fractions correspondant souvent à plusieurs nucléotides. Pour la séparation complète on procède à des rechromatographies sur papier après élimination de l'acide formique et du formiate par lyophilisation et par sublimation.

3° CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

Pour l'identification des bases puriques et pyrimidiques obtenues après hydrolyse acide (2 heures à 100° C en milieu perchlorique 7,5 N) on emploie le solvant de Kirby (206) pendant 18 heures à 25° C en chromatographie ascendante: méthanol — acide chlorhydrique concentré — eau distillée (7v- 2v- 1v).

Le système bidimensionnel de Bourdet et Mandel (34) et (35) est utilisé pour séparer l'UDP de l'ATP, le CMP du NAD et l'IMP de l'UMP. On pratique en première dimension une chromatographie ascendante de 72 heures avec le solvant: butanol III acide chlorhydrique N (7v- 3v) à 25° C. La deuxième séparation se fait par chromatographie descendante à 25° C. pendant 36 heures avec le solvant: propanol — ammoniaque concentrée — eau distillée (6v- 3v- 1v).

Pour la séparation des coenzymes à uridine diphosphates on se sert du solvant de Paladini et Leloir (295): alcool 95°, acétate d'ammonium M à pH 7,5 (7,5v -3v), à la température du laboratoire, en chromatographie descendante, pendant 36 heures.

Les sucres libérés par hydrolyse des coenzymes à uridine sont identifiés par chromatographie descendante 24 heures à 25° avec le solvant acétate d'éthyle pyridine — eau (2v -1v- 2v). Les oses ont été révélés par le réactif à la benzidine de Horrocks (179).

Pour des compléments d'identification, on a également employé l'isobutyrate d'ammonium (5v d'acide isobutyrique-3v d'ammoniaque 0,5N) en chromatographie descendante durant 12 à 16 heures à 25° C.

Les séparations ont été effectuées sur papier Whatmann 1.

4° TECHNIQUE DE DETERMINATION ENZYMATIQUE du NAD, NADP, $NADH_2$ et $NADPH_2$.

Nous utilisons la technique spectrophotométrique de Holzer (174).

On détermine le $NADH_2$ à l'aide de glycérophosphate déshydrogénase du muscle de lapin en présence du dihydroxyacétone phosphate et le $NADPH_2$ après addition dans le même milieu réactionnel d'acide glutamique déshydrogénase. Le NAD est dosé en présence d'alcool déshydrogénase de levure et le NADP en présence de glucose 6 phosphate déshydrogénase. Les accroissements et les baisses de D.O dans le milieu réactionnel sont mesurés à 340 mμ au spectrophotomètre Jobin-Yvon.

F. — *Techniques physicochimiques de fractionnement de l'acide ribonucléique.*

1° CHROMATOGRAPHIE SUR ALBUMINE METHYLEE.

La technique employée est la technique de Mandell et Hershey (244) modifiée (319). L'albumine méthylée employée est préparée à partir de la sérum-albumine de bœuf, fraction 5, produit Sigma. La variété de Kieselguhr que nous utilisons est la célite. L'élution est effectuée avec un gradient de pH et de concentration saline exponentiel de TRIS pH 0,02M. NaCl 0,1M et de TRIS pH 9,7 0,02M — NaCl M. La chambre de mélange des gradients a une capacité de 540 ml. L'éluat est recueilli en fraction de 6 ml sur lesquelles on détermine la D.O à 260 m μ au spectrophotomètre et la radioactivité dans un compteur à scintillation Packard.

2° ULTRACENTRIFUGATION EN GRADIENTS DE SACCHAROSE.

Le procédé employé est celui de Gros (152). Les gradients de saccharose utilisés vont soit de 5% à 20% selon Cheng (78) soit de 12,5% à 30%. Les centrifugations ont été effectuées à la Spinco soit dans le rotor SW 25 à 25.000 tours à la minute, soit dans le rotor SW 39 à 39.000 tours à la minute pendant 14 heures.

3° QUESTION DE L'EVALUATION DES «S».

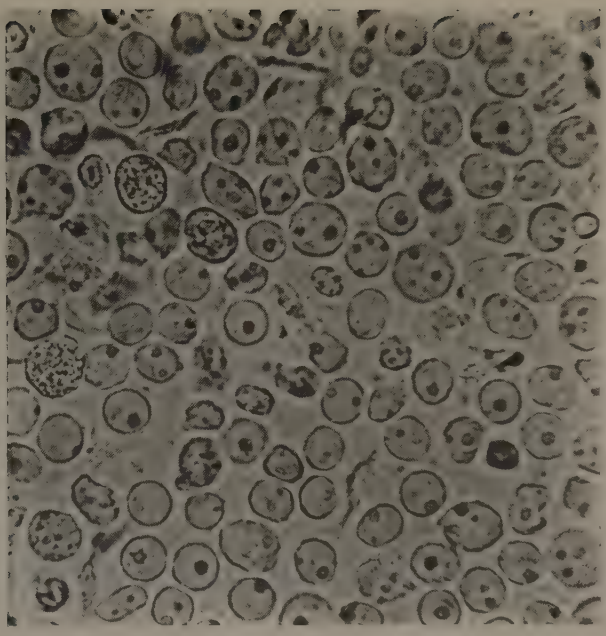
Pour nos études concernant les différents types d'ARN nucléaires nous n'avons pas évalué d'une façon directe les constantes de sédimentation. En général nous avons effectué des sédimentations de nos préparations d'ARN nucléaires en gradient de saccharose. Cette technique ne peut fournir que des valeurs relatives voire approximatives. Mais elle est suffisante pour distinguer les ARN lourds, type ribosomiques, des ARN à faible poids moléculaire du type ARN soluble. Notons aussi que, pour définir avec exactitude le poids moléculaire à partir de la constante de sédimentation (99) déterminée expérimentalement, il faut faire intervenir des caractéristiques physico-chimiques dont certaines (telle la forme et les dimensions des molécules) ne sont pas encore déterminées à l'heure actuelle en ce qui concerne les différents types d'ARN.

En pratique nous nous sommes limités à opérer essentiellement par comparaison. A cet effet nous avons d'abord fait déterminer la constante de sédimentation de l'ARN soluble et ribosomal cytoplasmique du foie, à l'ultracentrifugeuse analytique. Par ailleurs nous avons soumis les mêmes préparations d'ARN de référence à la sédimentation en gradient de saccharose dans nos conditions expérimentales.

G. — *Etude in vitro sur les noyaux isolés.*

1° TECHNIQUE DE PREPARATION DE NOYAUX.

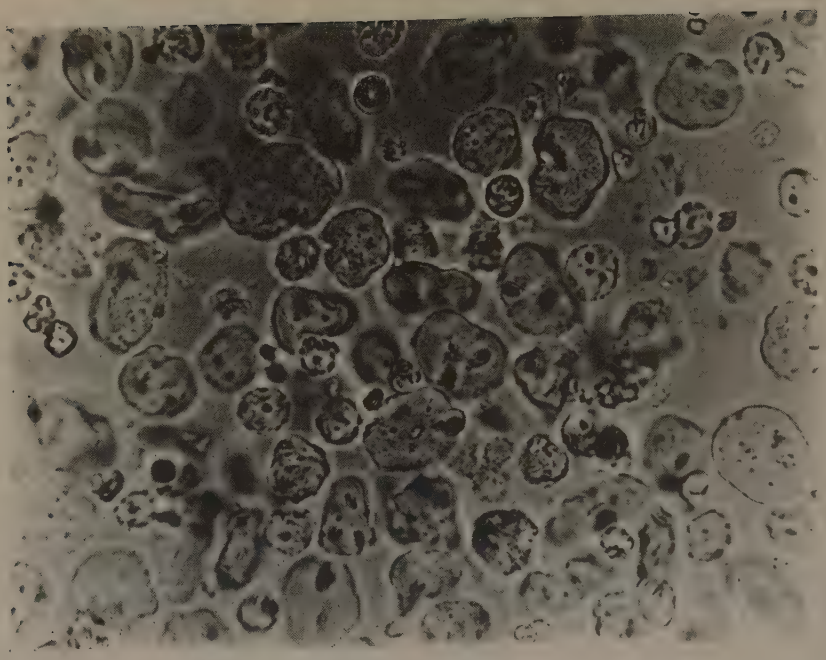
Pour l'isolement de noyaux de foie de rat et d'ascite de Zajdela nous avons employé la technique de Chauveau (75-76) que nous avons modifiée par la technique de Zalta (412). Cette dernière technique utilise les détergents nécessaires à la libération de toute trace de cytoplasme des noyaux de cellules ascitiques. Nous avons gardé le milieu hypertonique conseillé par Chauveau pour éviter les fuites de l'ARN nucléaire.



Photographie 2

Examen direct à l'immersion d'une préparation de noyaux de foie de rats au microscope à contraste de phases. (Grossissement 800 x environ.)

Dans chacun des essais on a utilisé 40 à 50 g de foie ou de cellules ascitiques provenant de 8 à 10 animaux. Toutes les opérations se font à 0°. Le foie est homogénéisé dans 15 à 20 volumes de saccharose 2,2 M contenant 0,001 M de chlorure de calcium dans un appareil de POTTER et ELVEJHEM (305) ou dans un homogénéisateur décrit par CHAUVEAU. Après homogénéisation on ajoute 1/10 du volume d'une solution aqueuse à 1,5% de nonyl - phénol - polyoxyéthylène à 6 molécules d'oxyde d'éthylène (Cémulsol NPT 6). Pour les cellules d'ascite on procède à un broyage supplémentaire de courte durée à l'Ultra-Turrax (JANKE-KUNKEL à Staufen / Breisgau, Allemagne). Le culot des noyaux est récupéré après centrifugation de 50 minutes à 30 000 tours Rotor 30 Spinco et repris dans du sacchorose 2,2 M 0,001 M $CaCl_2$ auquel on ajoute le 1/10 volume de nonyl - phénol - polyoxyéthylène à 12 molécules d'oxyde d'éthylène à 1,5% (cémulsol NPT 12) sous agitation constante. La suspension ainsi obtenue est broyée à l'Ultra-Turrax par fraction de 6 ml sous contrôle microscopique. Les noyaux hépatiques se libèrent à l'état pur plus rapidement que les cellules ascitiques. Les noyaux sont repris par le saccharose 2,2 M et 0,001 M de $CaCl_2$ et recentrifugés dans les mêmes conditions que précédemment. Les culots de centrifugation sont constitués par des noyaux



Photographie 3

Examen direct à l'immersion d'une préparation de noyaux de l'hépatome de Zajdela au microscope à contraste de phases. (Grossissement 800 x environ.)

propres, très peu contaminés par des débris cellulaires comme l'ont montré des examens systématiques au microscope à contraste de phase (voir photographies 2 et 3).

2° INCUBATION DES NOYAUX ISOLES IN VITRO.

Nous utilisons le milieu d'incubation de Logan (232) mélange à volume égal de solution A (pour 100 ml de solution il y a 1,8 g de glucose, 0,625 g de chlorure de sodium et 0,534 g de chlorure de magnésium) et de solution B (pour 100 ml il y a 2,506 g PO_4HNa_2, 12 H_2O, 0,414 g et PO_4H_2Na, H_2O et 8,55 g de saccharose). 2 ml de suspension de noyaux repris dans du saccharose 0,25 M (environ 15 ml de saccharose 0,25 M pour les noyaux provenant de 50 g de foie ou de 10 tumeurs) sont incubés dans un volume égal de milieu de Logan à 37°, sous agitation constante pendant des temps variables. L'incubation se fait en présence de $^{32}PO_4H_3$ à raison de 15 μ c par ml, soit de 1 μ c d'adénine-8-C^{14} ou d'acide orotique-6-C^{14} et en présence soit de 0,5 ml de bentonite d'une solution à 1,5%, soit de 10μ g de polyvinyl sulfate par ml de milieu d'incubation. La réaction d'incor-

poration est arrêtée par refroidissement brusque à — 10° suivi d'une centrifugation immédiate en vue de la séparation du milieu avec les noyaux.

H. — *Techniques de préparation d'ARN.*

Nous utilisons la technique de préparation d'ARN employant le phénol, décrit par KIRBY (208) avec certaines modifications dont celles de LITTAUER (230-222) et de SCHERRER (329).

1° PREPARATION D'ARN TOTAL.

Les foies et les tumeurs rapidement prélevés et congelés dans l'air liquide, sont broyés dans un moulin à café électrique. Le matériel broyé est repris dans 5 à 6 volumes de solution de complexon 10^{-4} M froid à pH 8 additionné du même volume de phénol redistillé à 90% dans l'eau distillée. Le mélange est agité sur un mélangeur magnétique pendant une heure à la température du laboratoire, puis centrifugé à 10 000 tours pendant 15 minutes. Les manipulations suivantes s'effectuent de nouveau à 0°. La phase aqueuse est soigneusement décantée à la pipette et gardée au froid. La phase phénolique et la phase intermédiaire sont extraites avec la moitié du volume de complexon froid 10^{-4} M pH 8 précédemment utilisé, recentrifugés à la même vitesse et pendant le même temps. Le surnageant obtenu est réuni au précédent; l'ensemble est précipité avec deux volumes d'alcool à 95° contenant à raison de 2% de d'acétate de sodium.

Notons que nous avons délaissé la précipitation alcoolique en présence d'acétate de potassium préconisée par KIRBY et préféré l'emploi de l'acétate de sodium. En effet, lorsqu'on emploie le dodécylsulfate dans la technique de préparation de l'ARN (comme nous le faisons dans les techniques décrites plus loin), celui-ci précipite avec l'ARN après addition d'alcool à 0°. Entre autre inconvénient qui apparaît dans ce cas, mentionnons la forte absorption dans les U. V. à 280 mμ du dodécylsulfate.

On laisse reposer le mélange à 0° pendant quelques heures. Le précipité blanc floconneux formé est séparé par centrifugation à froid. Le culot d'ARN est lavé une fois avec de l'alcool à 75° — acétate de sodium à 2 g %, et deux fois avec de l'alcool à 75%. Chaque lavage est séparé par une centrifugation à froid. L'ARN est redissous dans quelques ml, 8 à 10 ml, de TRIS 0,01 M pH 7,5, dialysé dans un sac traité (lavage à l'eau distillée et traitement par une solution de complexon 10^{-4} M que l'on change tous les deux ou trois jours, et rinçage abondant à l'eau distillée avant l'emploi) contre une solution NaCl 10^{-4} M pendant 12 heures environ en chambre froide. Le dialysat est centrifugé à froid. Le surnageant renfermant l'ARN est congelé puis lyophilisé immédiatement.

2° PREPARATION D'ARN NUCLEAIRE TOTAL.

La marche à suivre pour la préparation d'ARN nucléaire total découle de la technique qui vient d'être décrite.

Les noyaux isolés selon la technique décrite ailleurs sont repris dans 25 ml de TRIS 0,01 M pH 7,6 contenant 1,25 g % de dodécylsulfate et 0,5 g % de naphtalène disulfonate de sodium. On ajoute 5 ml de bentonite à 1,25 % et on traite le mélange avec 30 ml de phénol MERCK redistillé saturé d'eau, enrichi de 8 hydroxyquinoléine à 0,1 %. La précipitation et la séparation s'effectuent comme décrit plus haut. Le mélange est agité sur agitateur magnétique pendant une heure à 0°, puis centrifugé à 10 000 tours pendant 15 minutes à froid. La phase aqueuse est séparée par décantation et conservée au froid. La phase phénolique avec la phase intermédiaire sont réextraites avec 10 ml d'une solution de TRIS 0,01 M pH 7,6 contenant comme précédemment du dodécylsulfate et du naphtalène disulfonate de sodium. Le mélange est centrifugé dans les mêmes conditions que lors de la première extraction. Le surnageant obtenu est réuni au précédent. L'ensemble est précipité avec deux volumes d'alcool à 95° contenant de l'acétate de sodium à raison de 2 g %. On laisse précipiter l'ARN pendant quelques heures à 0°.

Nous avons vérifié qu'un repos de 30 minutes à — 20° était suffisant pour que l'ARN précipite complètement.

Le précipité est recueilli par une centrifugation de 20 minutes à froid à 6 000 tours/minute. Le culot est lavé une fois avec de l'alcool à 75° — acétate de sodium à 2 g % et deux fois avec de l'alcool à 75°. Le précipité obtenu, constitué par de l'ARN et de l'ADN est dissous dans 5 à 7 ml de TRIS 0,01 M pH 7,4, 10^{-2} M acétate de magnésium incubé avec la DNAse à raison de 50 µ g/ml, en présence de traces de bentonite et de 2 µ g/ml de PVS à 20° pendant 5 minutes.

Les échantillons de DNAse sont souvent contaminés par la RNAse. Les tentatives de purification par chromatographie sur DEAE Cellulose nous ont rarement donné satisfaction. Nous avons de ce fait simplement sélectionné pour usage, les échantillons de DNAse qui ne contenait pas de RNAse.

Dès la fin de l'incubation on acidifie à l'acide acétique jusqu'à pH 5,5. On précipite l'ARN de la solution avec 2 volumes le mélange alcool — acétate de sodium après avoir éliminé la bentonite par centrifugation. Dans ces conditions nous précipitons également certains oligodésoxynucléotides et l'ADN partiellement dégradé qui a résisté à l'action de la DNAse.

3° PREPARATION D'ARN DE FRACTIONS SUBNUCLEAIRES.

Pour le fractionnement nucléaire nous utilisons une forme modifiée de la technique de REVEL (319) qui est elle-même dérivée de celle d'ALLFREY et MIRSKY (5).

a) *Technique de fractionnement subnucléaire.*

Les noyaux préparés, selon la technique déjà décrite, à partir de 40 g de foie environ, ou de tumeurs provenant de 8 à 10 rats, sont repris dans 15 ml de tampon TRIS pH 7,6 0,001 M froid. Ce tampon contient du polyvinylsulfate (PVS) à raison de 2 µg à 40 µg par ml, suivant l'origine du produit.

Nous préférons travailler en présence de PVS au lieu de bentonite, car ce dernier inhibiteur de RNAse, doué de fortes propriétés adsorbantes, peut interférer dans le fractionnement subnucléaire au cours des centrifugations en adsorbant de l'ARN.

La suspension nucléaire en milieu hypotonique, est homogénéisée (dans un appareil de Potter) et mélangée sur agitateur magnétique à 0° pendant 15 minutes pour lyser les noyaux. On rend le milieu 0,5 M en tampon TRIS et 3×10^{-3} M en $CaCl_2$ par addition de 15 ml de tampon TRIS M — 6×10^{-3} M $CaCl_2$ et de PVS à la même concentration que précédemment. On homogénéise dans l'appareil de Potter (5 aller et retour du piston) et on laisse reposer la suspension 10 minutes à 0°. L'homogénéisation ainsi que la période de repos sont répétées deux fois.

L'extrait est centrifugé pendant 20 minutes à 0° à 6 000 tours/minute. On obtient un surnageant qui est le suc nucléaire et un culot qui correspond aux chromosomes et aux nucléoles.

Le culot, obtenu après traitement au tampon TRIS 0,5 M est repris par 20 ml NaCl M enrichi de PVS et mélangé sur agitateur magnétique la nuit à 0°. On centrifuge 15 minutes à 25 000 tours/minute dans le Rotor 40 à la Spinco. Le surnageant obtenu correspond à la fraction chromosomale et le culot grisâtre aux nucléoles.

Dans certaines expériences, le suc nucléaire a été soumis immédiatement après son obtention, à une ultracentrifugation à la Spinco de 90 minutes à 105 000 g dans le rotor 40. On recueille «le surnageant nucléaire» et les ribosomes nucléaires, ces derniers sous forme de petits culots transparents.

b) *Préparation de l'ARN.*

La fraction nucléolaire est reprise par 6 à 8 ml d'une solution de TRIS 0,01 M pH 7,6 contenant 2 g % de dodécylsulfate et 0,5 g % de naphtalène disulfonate de sodium et de traces de bentonite et de PVS. On procède à la séparation de l'ARN nucléolaire en deux fractions par deux voies différentes. La première façon consiste à rendre le milieu 4 M en urée et à extraire avec le même volume de phénol à 90% dans l'eau, contenant 0,1 g % d'hydroxyquinoléine pendant 3 heures à 0°. Dans la seconde technique de séparation, on traite la fraction nucléolaire totale avec un volume de phénol à 90% enrichi de 8 hydroxyquinoléine dans un bain-marie à 65° C pendant 15 minutes exactement. Notons que dans ces conditions la température à l'intérieur du tube

d'extraction est en général de 47°. La suite des manipulations est identique pour les deux techniques. La séparation des phases phénolique et intermédiaire de la phase aqueuse se fait par décantation à la pipette après centrifugation de 15 minutes à 10 000 tours/minute à 0°. Les phases phénoliques et intermédiaires sont réextraites avec le même volume de TRIS 0,01 M pH 7,6, enrichi de dodécylsulfate, de naphtalène disulfonate de sodium et de bentonite et de PVS. Les phases aqueuses réunies, précipitées par 2 volumes d'alcool — acétate de sodium, constituent la fraction nucléolaire I. L'interphase et la partie phénolique forment la fraction nucléolaire II.

Le précipité d'ARN de la fraction nucléolaire I est recueilli par une centrifugation de 20 minutes à froid à 6 000 tours/minutes. Le culot est lavé une fois avec de l'alcool à 75° — acétate de sodium à 2% et deux fois avec de l'alcool à 75%. Le précipité est dissous dans 5 ml d'NaCl 0,1 M enrichi avec du PVS à 2 μ g/ml et reprécipité par 2 volumes d'alcool 95° — acétate de Na à 2%. Après 30 minutes d'attente à 0° on sépare à nouveau par centrifugation le matériel nucléique précipité et on procède aux lavages comme ci-dessus. Le précipité final est redissous dans 3 à 5 ml d'NaCl 0,1 M renfermant 2 μ g/ml de PVS.

Pour l'isolement de leur ARN, le suc nucléaire et la fraction chromosomale ont été traités au phénol chaud dans les mêmes conditions que la fraction nucléolaire.

Dans certaines expériences nous nous sommes bornés à séparer les différentes fractions subnucléaires en vue du dosage de l'ARN et de l'ADN. Dans ce cas celles-ci ont été précipitées à l'acide trichloracétique, délipidées, hydrolysées en milieu alcalin selon les procédés usuels déjà décrits.

En ce qui concerne la fraction nucléolaire II, pour éliminer le phénol nous avons d'abord traité (3 fois) les préparations par un mélange alcool-éther (4v/1v).

I. — *Expression des résultats.*

Pour présenter nos résultats expérimentaux, nous avons fait appel à des méthodes de statistique simples. Nous supposons que la distribution totale de nos données expérimentales, constituant un échantillonnage au hasard, suit la loi de Gauss. On peut d'ailleurs démontrer (229) pour qu'une grandeur x soumise à de nombreux facteurs suive la loi normale dite de Gauss, il suffit que ces facteurs restent de même importance. «Dans les conditions habituellement réalisées la somme d'un grand nombre de variables aléatoires quelques soient leurs lois de distribution, tend à être distribué suivant la loi normale.»

Nous remplaçons nos n valeurs expérimentales, pour un type d'expériences donné, par leur moyenne arithmétique accompagnée de l'écart-type ou déviation standard s, indice qui rend compte de la dispersion des valeurs expérimentales. Rappelons que l'écart-type est la racine carrée de la variance s^2. La variance d'une série de données expérimentales correspond à la moyenne des carrés des écarts de chaque mesure par rapport à la moyenne. La loi de GAUSS est entièrement connue lorsque la moyenne est suivie de la déviation standard.

Dans notre travail nous sommes en fait très souvent conduit à comparer deux moyennes provenant de deux séries expérimentales. La loi de distribution de moyennes qui est une loi (384) «absolument générale, fixe la façon dont se distribuent les moyennes d'échantillons prélevés au hasard dans une population donnée. Même si la distribution des observations ne suit pas la loi de GAUSS celle des moyennes tend à se rapprocher de façon d'autant plus étroite que l'échantillon est plus abondant».

Comme dans toute la méthodologie statistique, le degré de certitude d'une conclusion, obtenue d'après le résultat d'un test statistique, est exprimé en pourcentage de probabilité p. Nous admettons comme seuil de signification 5%, c'est-à-dire que toute hypothèse est considérée comme non vraisemblable si elle ne tient compte que de 5% des observations.

Le test statistique que nous avons utilisé pour la comparaison des moyennes est le test «t» mis au point par STUDENT-FISHER. Rappelons que «t» représente l'écart réduit et qu'il est l'écart à la moyenne mesurée dans une unité égale à l'écart-type. Dans la distribution normale avec un grand nombre d'observations, il n'y a que 5 pour 100 de chances pour avoir un écart réduit supérieur à 2. C'est un test à emploi très général dans le problème de comparaison de moyennes: soit d'une moyenne expérimentale avec une valeur hypothétique ou théorique, soit de comparaison directe de deux moyennes expérimentales. Il permet surtout d'utiliser les petites séries expérimentales où n est un nombre inférieur à 30, sans que la distribution totale soit connue. STUDENT-FISHER ayant étudié l'écart-réduit t, évalué d'après la déviation standard, a conclu que «t» ne suit pas exactement la loi de GAUSS dans le cas où l'échantillonnage est faible, mais la loi dont il a lui-même établi la forme analytique. Contrairement à la loi de GAUSS utilisée dans le cas où n est grand, la probabilité p évaluée d'après «t» de STUDENT-FISHER dépend du nombre d'observations ou des degrés de liberté. La loi de STUDENT-FISHER pour n petit a été traduite sous forme de table numérique, facilement utilisable. La table de la distribution «t» de STUDENT-FISHER permet d'évaluer la probabilité pour qu'une valeur observée t soit due au hasard. En fait on compare, en tenant compte du degré de liberté, la valeur trouvée t à celle qui dans le tableau correspond à une probabilité égale à 0,05.

En pratique nous avons procédé comme suit:

a) Calcul de la déviation standard s:

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

c'est la valeur s qui précédée du signe ± accompagne la moyenne.

n = nombre d'expériences

x = valeur expérimentale

$\bar{x}$ = moyenne des valeurs expérimentales = $\frac{\Sigma x}{n}$

b) Lorsque les animaux témoins et en expérience appartiennent à la même portée et que nous comparons le même tissu nous calculons le rapport $\frac{\text{animal traité}}{\text{animal témoin}}$

L'estimation de l'écart-réduit se fait d'après la formule:

$$t = \frac{1 - \bar{x}}{s/\sqrt{n}}$$

et la table de distribution de STUDENT-FISHER est consultée à la ligne de n — 1 degrés de libertés.

c) Calcul de l'écart-réduit t lors de la comparaison de 2 moyennes de 2 séries expérimentales indépendantes: par exemple entre celle du foie normal et celle de l'hépatome.

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{x}'}{s} \sqrt{\frac{n - n'}{n + n'}}$$

$$\text{ou } s = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2 + \Sigma (x' - \bar{x}')^2}{n + n' - 2}}$$

le nombre de degrés de liberté à utiliser: $n + n' - 2$

n et n' = nombres d'expériences

x et x' = valeurs expérimentales

$\bar{x}$ et $\bar{x}'$ = moyennes des 2 séries d'expériences.

I. — RÉGULATION A L'ÉCHELLE MOLÉCULAIRE.

ETUDE DES NUCLEOTIDES LIBRES DU FOIE NORMAL, DU FOIE EN REGENERATION ET DE L'HEPATOME DE ZAJDELA.

INTRODUCTION.

Dans le cadre des études sur la régulation de la biosynthèse des acides nucléiques et en particulier de l'ARN, nous avons recherché l'existence d'un ajustement éventuel du pool des nucléotides libres dans divers états fonctionnels de la cellule: état stationnaire, prolifération normale et tumorale. Il est à peine nécessaire de rappeler ici le rôle bien connu des nucléotides libres à la fois comme précurseurs des acides nucléiques (29 - 50 - 55 - 59 - 154 - 184 - 396) et comme cofacteurs dans la biosynthèse et dans la dégradation des mucopolysaccharides, des phosphatides, des protéines (171 - 411 - 21) et de certains glucides.

Schmitz (333-334-335-336-337-338) dans ses travaux sur les nucléotides libres des différents tissus conclut que le taux de certains nucléosides polyphosphates est plus élevé dans le carcinome de Flexner-Jobling que dans le foie normal et il trouve moins de coenzymes à uridine dans l'ascite de Yoshida et dans celle de Walker que dans le sarcome de Yoshida et le carcinome de Walker, tumeurs pauvres en NAD et riches en nucléotides uridyliques. Mais il est difficile de comparer des cellules aussi différentes que les tumeurs dont s'est servi Schmitz et les hépatocytes. De plus la répartition des nucléotides libres dans le foie qui lui sert de référence, permet de supposer l'existence d'une hydrolyse préalable à la chromatographie.

Saukkonen (327) signale une forte diminution d'UDPAG, UDPG, UDPGa dans l'ascite, comparée à d'autres tumeurs solides. Il constate la prédominance des nucléotides riches en énergie dans les cellules cancéreuses par rapport à la teneur du foie ou du rein ou celle de la levure.

Les travaux de Horie (177-178) mettent en évidence une diminution de nucléotides totaux dont surtout les pyridinenucléotides, dans deux carcinomes différents ~~du foie~~ par rapport à ceux du foie, du muscle et du cœur.

Les nucléotides libres du foie normal ont servi dans beaucoup de travaux (54-73-317-345) comme élément de comparaison ou de référence et les cellules tumorales qui ont été comparées, étaient d'origine et de morphologie très éloignées de la cellule hépatique. Or, on sait que pour un même animal la teneur en nucléotides libres varie considérablement d'un tissu à l'autre. Si le problème de l'ajustement du pool des nucléotides libres dans les tumeurs a été abordé, cela a été soit avec des méthodes qui prêtent à des critiques, soit dans des conditions expérimentales qui n'ont pas la signification qu'on désirerait leur attribuer.

Nous avons étudié comparativement les nucléotides libres du foie et ceux de l'hépatome ascitique de Zajdela. Comme il s'agit d'une tumeur relativement peu dédifférenciée dans laquelle on retrouve les travées du tissu hépatique, les conditions paraissent particulièrement favorables pour une confrontation valable.

Par ailleurs il nous a paru intéressant d'examiner l'effet des rayons X sur l'ensemble des nucléotides libres, dans le but de rechercher le point d'attaque des rayonnements qui produit l'inhibition de la prolifération des tumeurs.

Nous avons trouvé une différence significative entre le taux de NAD et NADP dans le foie normal et l'hépatome de Zajdela, au moyen de la chromatographie sur colonne échangeuse d'ions. Mais étant donné qu'au cours des chromatographies sur colonne échangeuse d'ions on opère en milieu acide, les formes réduites $NADH_2$ et $NADPH_2$ sont dégradées; on a de ce fait étudié ces nucléotides aussi bien dans le foie normal que dans le foie d'animaux porteurs de la tumeur et dans l'hépatome de Zajdela par des méthodes enzymatiques. Pour préciser l'aptitude du tissu hépatique et de l'hépatome à la synthèse des phosphopyridinenucléotides, nous avons étudié l'effet de la nicotinamide qui, comme on sait intensifie la biosynthèse de NAD (196).

Pour compléter les données quantitatives, nous avons également étudié la vitesse d'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les nucléotides adényliques du foie et de l'hépatome ascitique chez le même animal.

2° CHOIX DES TECHNIQUES.

Les résultats des différents auteurs concernant les nucléotides du foie ou des tumeurs sont fonction du mode de prélèvement du tissu. Ce n'est que la rapide congélation qui peut empêcher la dégradation des nucléosides polyphosphates qui se traduit par une déphosphorylation des nucléosides triphosphates et une augmentation de nucléotides monophosphates (266). Cette vitesse de dégradation est très grande, de l'ordre de la seconde, le rapport ATP/ADP diminue très vite ainsi que le montreront nos résultats, ce qui est en accord avec les résultats de Bucher et collaborateurs (173). Cet auteur suggère que tous les métabolites ne sont pas aussi fragiles que l'ATP, et nous le pensons des autres nucléotides; c'est pourquoi le rapport ATP/ADP est le critère le plus sensible pour détecter les variations des métabolites dûes au prélèvement du tissu et qui entachent les valeurs réelles du status in vivo. Dans le même ordre d'idée Reid (317) constate une variation *post mortem* du rapport ATP/UTP dans le foie. Cet auteur montre qu'il est préférable d'extraire les nucléotides sur l'organe broyé à l'état congelé. L'importance égale de l'AMP, ADP et ATP signalé dans le foie se trouve ainsi expliquée par la dégradation de l'ATP lors du prélèvement du tissu. L'importance relative de l'ADP par rapport à l'ATP mise en évidence dans le foie de rat par Chambon (73) et dans le liquide cytoplasmique par Busch et collaborateurs (54) provient sans doute aussi du fait que l'ATP se soit dégradé, vu le rapport ATP/ADP de 0,5 trouvé par les auteurs.

Le problème de la dégradation des nucléosides polyphosphates de l'hépatome ascitique est différent de celui du foie. La congélation in vivo de l'animal pour le prélèvement de cellules cancéreuses est impossible étant donné que nous avons à faire à une tumeur liquide, qui baigne les organes abdominaux. Par ailleurs les cellules cancéreuses elles-mêmes sont dispersées dans un liquide secrété, nutritif. Elles peuvent être considérées pratiquement comme une culture de cellules in vivo, où l'organisme du rat est l'hôte et fournit le milieu de culture. Ainsi lors du sacrifice de l'animal, les cellules ascitiques prélevées avec leur milieu et manipulées à 0°, continuent encore à vivre et ne se dégradent pas immédiatement, comme c'est le cas du foie. Les importantes quantités de nucléosides polyphosphates rencontrées dans l'hépatome, comme on va le montrer, peuvent en réalité être encore plus fortes si on pouvait aussi congeler le matériel tumoral dans l'azote liquide comme le foie normal.

Pour la technique de séparation des nucléotides libres nous nous sommes arrêtés à celle de Hurlbert (183), adaptées par Klethi (213). Nous utilisons la résine Dowex 1 $\times$ 8 au lieu de Dowex 2 $\times$ 8 comme Schmitz (339) sur des colonnes relativement hautes (40 cm), mais non aussi importantes que celle de Bergkvist (26) qui nécessitent de plus

grands volumes d'éluat, ou celles de PONTIS et BLUMSON (304) qui atteignent 140 cm, car le pouvoir de résolution d'une colonne de chromatographie n'est pas seulement fonction de sa hauteur. L'emploi de gradient «convexe» utilisé par GILBERT (132) conduit aussi à l'élution simultanée de nucléotides comme c'est le cas de l'élution avec des gradients de concentration «concave». Plus récemment ANDERSON et LADD (9) ont publié une technique de séparation de nucléotides utilisant comme nous le Dowex 1 × 8 mais éluant avec un gradient de concentration linéaire à l'acétate, à pH constant; cette méthode ne donne pas de meilleures résolutions que celle que nous utilisons.

Pour l'identification complète des nucléotides nous avons eu recours à la rechromatographie sur papier. Le problème de l'absorption propre du papier des spots de nucléotides sera discuté dans une autre partie du présent travail.

Pour le dosage des phosphopyridinenucléotides nous avons utilisé la technique spectrophotométrique de HOLZER (175) voisine de celle de GLOCK et MC LEAN (133) qui donne des valeurs comparables à la technique fluorimétrique de BASSHAM (16). Nous n'avons pas étudié la forme de «NAD — extra» plus récemment décrite par PURVIS (311). Les travaux de BORST (36 - 37) effectués en employant les techniques fluorimétriques de JACOBSON et ASTRACHAN (190) et celle de CIOTTI et KAPLAN (80) n'ont pas pu mettre en évidence dans les mitochondries de cellules ascitiques de rat la forme riche en énergie du NAD décrit par PURVIS. KLINGENBERG (214) qui a observé des variations *post mortem* de $NADH_2$ dans les mitochondries des différents tissus a constaté que pour le foie l'augmentation de $NADH_2$ dûe à l'anaérobiose *post mortem* est très faible. Nous avons cependant procédé à nos déterminations enzymatiques dans des conditions expérimentales particulièrement étudiées en vue d'éviter au maximum les phénomènes qui ne reflètent pas l'état in vivo.

3° MISE AU POINT DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES NUCLEOTIDES LIBRES.

Dans les différents travaux publiés (54 - 73 - 174 - 177 - 223 - 224 - 336) le taux de nucléosides triphosphates dans le foie est faible, seul BUCHER (345) signale une teneur élevée de ces composés. Nous avons constaté que même si on immerge le foie dans l'air liquide immédiatement après une dissection rapide, les valeurs des nucléosides triphosphates sont relativement faibles. Nous avons recherché un procédé permettant d'éviter l'hydrolyse de nucléosides triphosphates et nous avons trouvé comme étant la plus favorable la technique suivante: après ouverture de l'abdomen sous légère anesthésie, et tout en respectant les connections vasculaires et nerveuses, le foie est rapidement dégagé et séparé des autres organes par une bande de gaze qui sépare tous les organes abdominaux. On évite ainsi au

moment de la congélation à l'air liquide que d'autres organes s'accolent au foie comme c'est le cas dans d'autres techniques (105 - 173 - 403). Le rat est alors plongé dans l'air liquide dans un vase Dewar à très grand diamètre, de telle façon que c'est le foie qui entre en premier en contact avec l'air liquide. Toutes les parties supérieures, antérieures, inférieures du foie sont alors immédiatement congelées et peuvent être séparées avec un ciseau et un marteau des couches plus profondes dont la congélation n'est pas aussi instantanée.

Dans la figure (1) nous avons réuni les valeurs moyennes (de 3 à 4 expériences par type d'essai) des nucléotides à adénine qui permettent d'apprécier la rapidité de la dégradation des nucléosides triphosphates au cours du prélèvement tissulaire. On notera les différences considérables avec les taux trouvés par le procédé que nous préconisons et la technique de prélèvement couramment employée. En effet, même quand on congèle le foie immédiatement dans l'air liquide on trouve en moyenne 18,4% des nucléotides adényliques sous forme

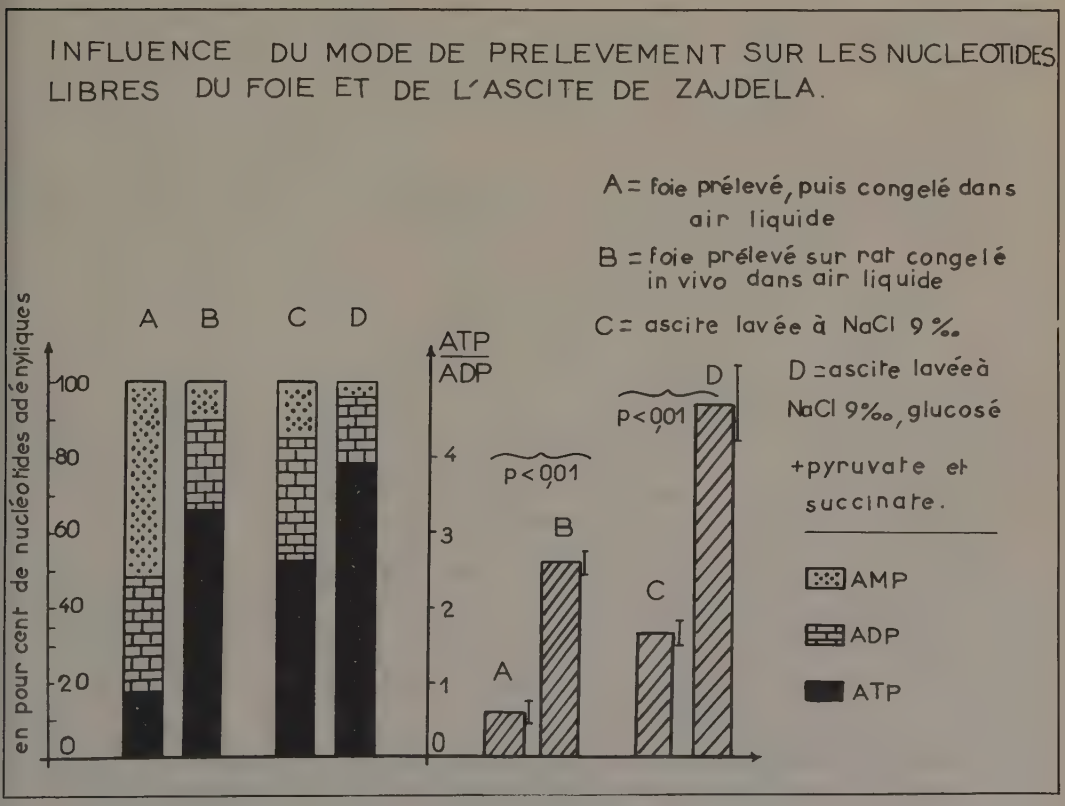


FIGURE 1

d'ATP alors que pour notre méthode il est de 65,8%. Les valeurs d'ATP sont systématiquement beaucoup plus élevées. De même le rapport ATP/ADP avec la méthode couramment employée n'est que de 0,6 alors qu'après congélation *in situ* on trouve 2,73. Il n'est pas douteux que le rapport ATP/ADP plus élevé reflète mieux les réalités *in vivo*.

Comme dans le cas des cellules hépatiques, il se posait également le problème de la conservation du taux de nucléosides triphosphates dans les cellules d'ascite, au cours des lavages nécessaires qui précèdent l'extraction acide. Nous avons pensé qu'il serait favorable d'effectuer le prélèvement et le lavage dans un liquide contenant des substrats d'oxydation (212). Dans ces conditions les cellules d'ascite, adaptées à une nutrition par imbibition, peuvent maintenir leur métabolisme et leur taux de phosphorylation. La figure (1) révèle effectivement, si on lave les cellules avec de NaCl 9‰, que le taux d'ATP est en moyenne de 53,5% alors que l'on trouve 79,2% si l'on maintient dans le milieu des substrats d'oxydation: glucose 1 g ‰, pyruvate de sodium 96 mg‰ et succinate de sodium 8,4 mg‰. De même le rapport ATP/ADP dans le mode de prélèvement que nous préconisons est nettement supérieur à ce que l'on obtient au cours des lavages qui respectent le métabolisme cellulaire. Ainsi a-t-il été possible de maintenir le métabolisme cellulaire des cellules d'ascite au cours des lavages qui s'imposaient, et d'obtenir des conditions qui sont très proches de l'état physiologique. Les manipulations ont été plus simples pour le foie, où l'emploi de l'azote liquide permet de fixer l'état cellulaire tel qu'il existe *in vivo*.

4° RESULTATS.

a) *Etude qualitative.*

Les figures (2 - 3 - 4 - 5 - 6) représentent les diagrammes d'élution des nucléotides libres du foie normal dans différentes conditions de prélèvement, du foie en régénération, et des cellules ascitiques de Zajdela après et sans irradiation aux RX. Nous indiquons les nucléotides présents dans chaque pic sur la base des rechromatographies sur papier et données analytiques effectuées selon les méthodes déjà indiquées.

Sans insister sur les diagrammes actuellement classiques, signalons quelques particularités.

Pour la tumeur, nous trouvons dans le pic précédant celui de l'AMP du glutathion identifié par chromatographie sur papier, et par sa réaction à la ninhydrine et à l'iodoplatinate (378a). Avec des quantités

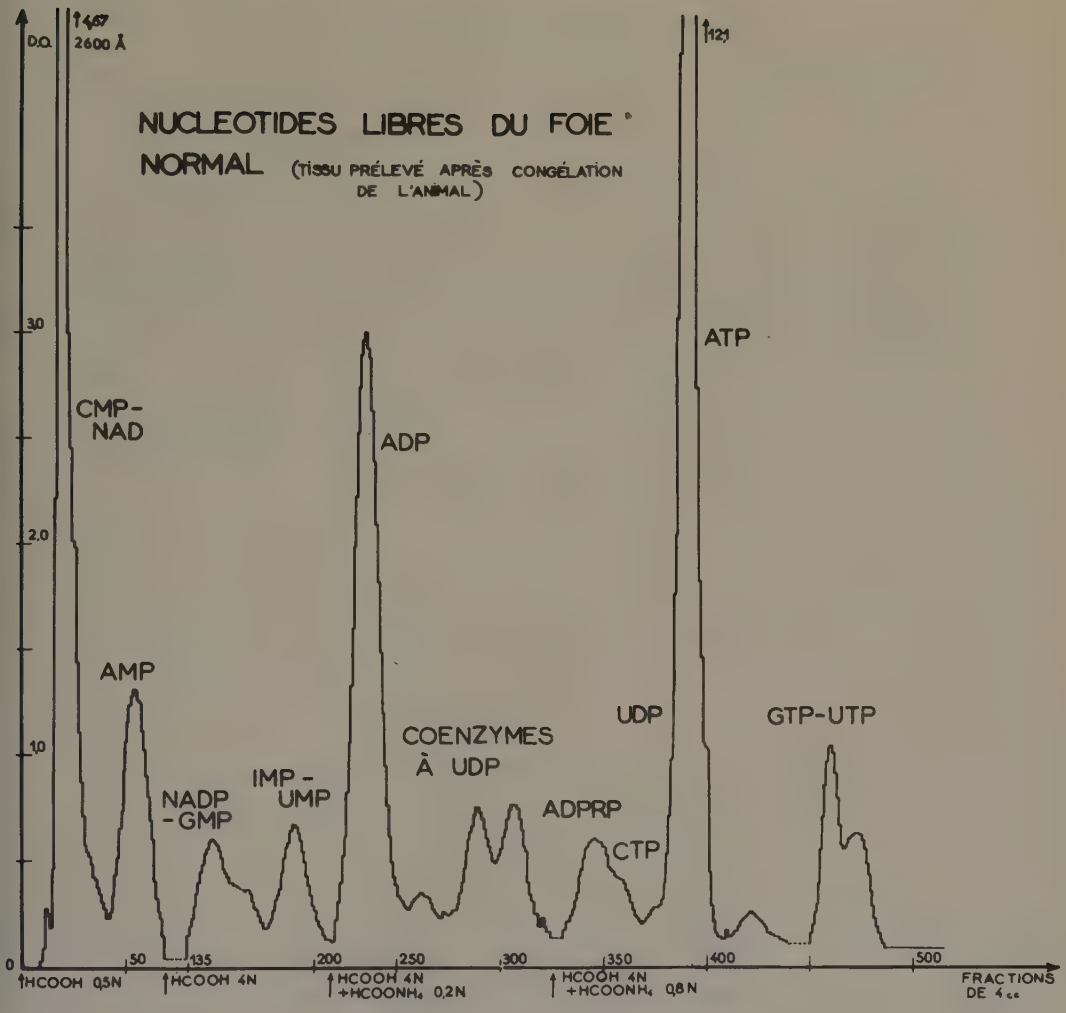


FIGURE 2

équivalentes de cellules hépatiques, ce constituant ne peut être mis en évidence, sans doute en raison des quantités très faibles qui y existent et qui sont inférieures à la limite de sensibilité de nos méthodes.

Dans le pic contenant l'IMP et l'UMP aussi bien dans le cas du foie et de la tumeur nous avons mis en évidence l'ADPR, produit de dégradation du NADH décrit par SCHNITGER (345) dans les mitochondries du foie humain et du foie de rat et isolé par HANSEN (157).

Dans la branche descendante du pic contenant l'ADP, on trouve un pigment jaune qui correspond au FAD comme l'a signalé Schmitz (339). Dans le cas de la tumeur de Zajdela le taux de ce pigment est infiniment plus faible.

Dans le cas du foie on note une ébauche de séparation des coenzymes à UDP. Ceci n'est pas le cas de la tumeur, ce qui est également l'indice de quantités plus faibles de ces composés. Après l'élution des coenzymes à uridine on a trouvé un composé ayant le rapport d'absorption d'U.V. de nucléotide à adénine et les caractéristiques analytiques et chromatographiques de l'ADPRP produit de dégradation de $NADPH_2$ signalé par Siekevitz (355 - 356) et étudié par Schnitger (345) dans les mitochondries hépatiques.

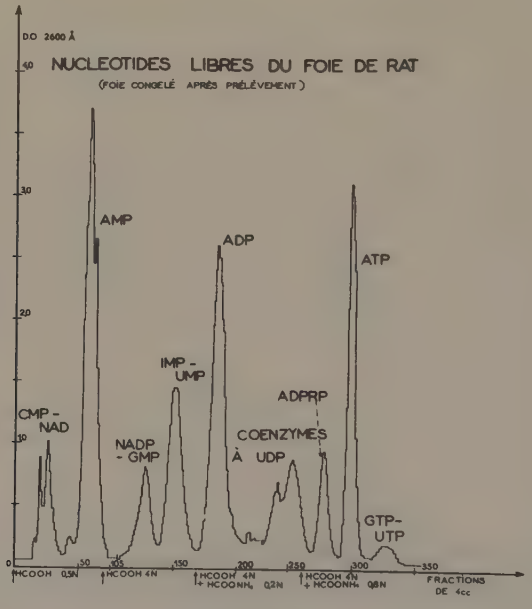


FIGURE 3

Nous avons pratiqué par ailleurs la réaction de Brody (43) pour la mise en évidence de nucléotides à désoxyribose sur l'ensemble des fractions lyophilisées correspondant aux différents pics obtenus après chromatographie sur résine. Pour le foie nous n'avons pas de réactions positives bien que nous ayons réuni les fractions de plusieurs chromatographies pour les effectuer. D'ailleurs pour mettre en évidence les désoxynucléotides dans le foie de rat, Schneider (324 - 344) a opéré sur un très grand nombre d'animaux dix fois supérieur au nombre de rats que nous utilisons par expérience. Par contre, pour

l'hépatome de Zajdela, malgré la quantité relativement faible du tissu utilisé, nous avons une réaction de BRODY positive au niveau du CMP, de l'UMP et de l'UTP, ce qui correspond respectivement au 5dCMP, au 5dCDP et TMP et au TTP et qui est conforme aux résultats de POTTER et collaborateurs (306).

Ainsi sur le plan qualitatif la seule différence entre le foie et l'hépatome est la présence dans l'acido-soluble dans ce dernier, des désoxyribonucléotides précurseurs de l'ADN. C'est un fait qui n'est pas étonnant mais qui indique un ajustement du pool des nucléotides au niveau des synthèses des polydésoxyribonucléotides. Ce phénomène apparaît d'une façon particulièrement évidente après irradiation aux RX. On assiste alors à une inhibition de la synthèse de l'ADN avec l'accumulation des précurseurs et en particulier du TTP qui apparaît nettement dans les diagrammes d'élution des colonnes chromatographiques.

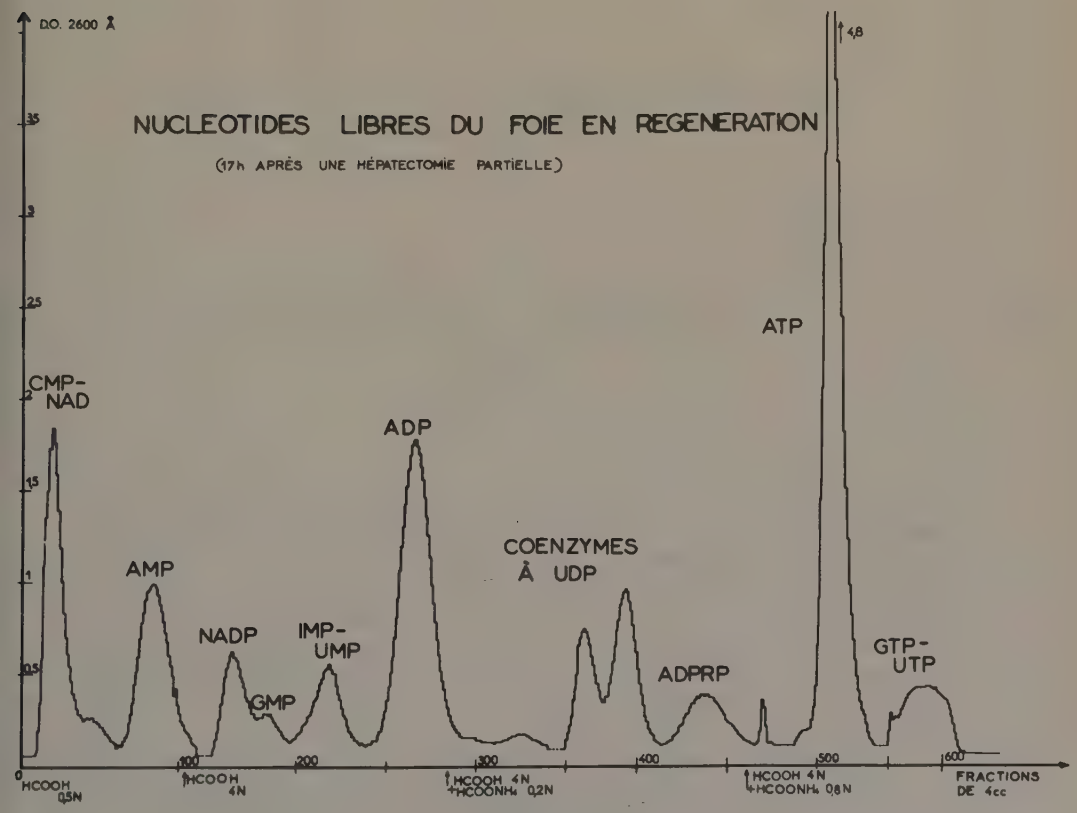


FIGURE 4

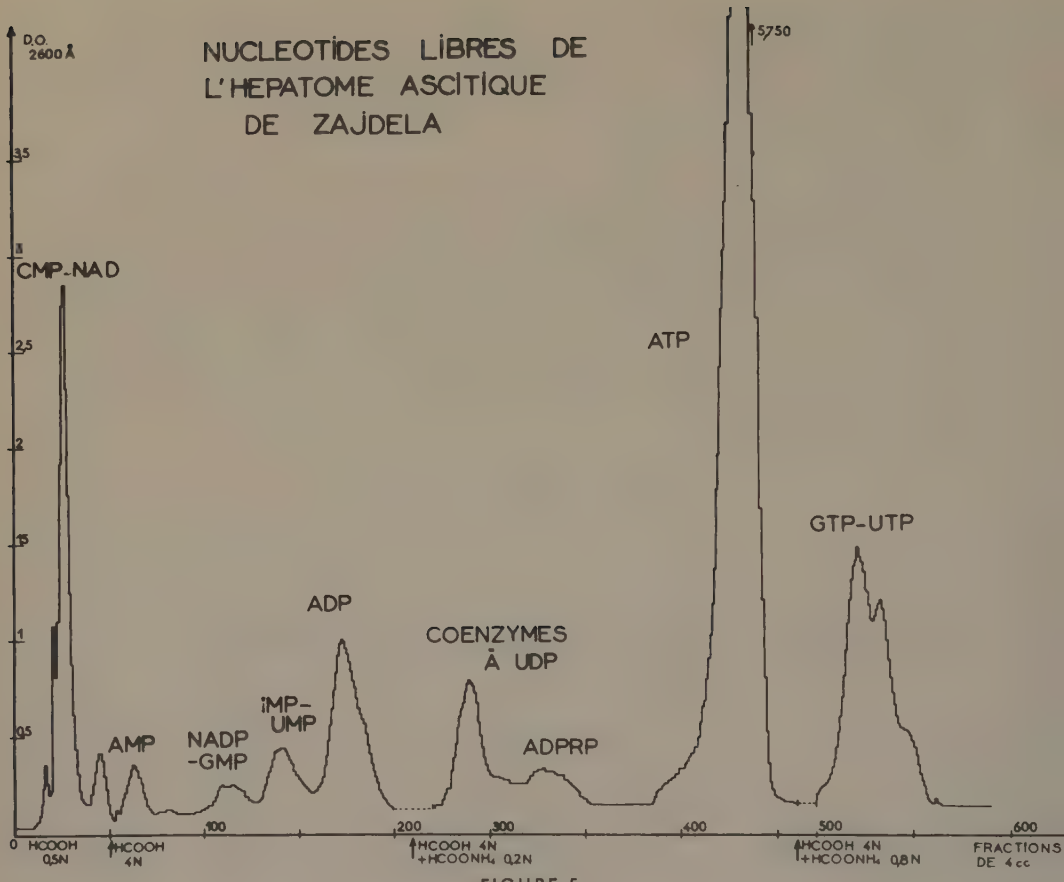


FIGURE 5

b) *Etude quantitative.*

Le tableau (6) indique la répartition moyenne des différents nucléotides en μ moles par g de protéides pour le foie normal, le foie en régénération et l'ascite après et sans irradiation aux RX. Nous avons rapporté les valeurs aux protéides, car la détermination du poids frais, voire du poids sec dans les cas de cellules d'ascite peut être sujet à caution vu qu'on a à faire à un tissu liquide et qu'on effectue des lavages avec un liquide contenant des substances dissoutes. On pourrait aisément recalculer les chiffres par rapport à l'ADN compte tenu des chiffres indiqués plus loin.

En appliquant le test «t» de STUDENT-FISCHER (113) concernant les moyennes d'un petit nombre d'échantillons on met en évidence les différences significatives suivantes ($p < 0,05$): la comparaison de

FIGURE 6

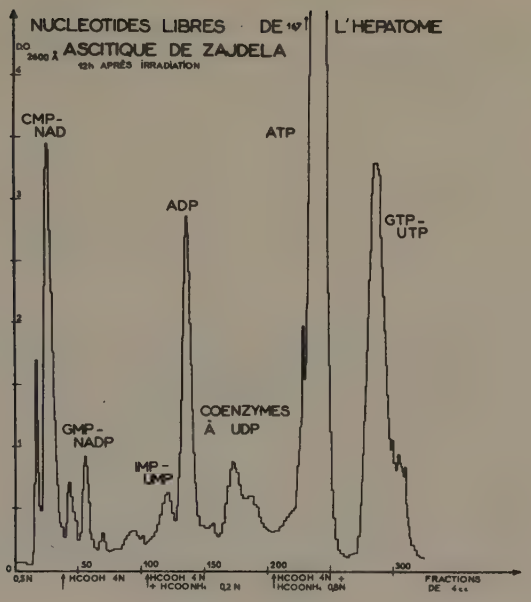


TABLEAU 6

REPARTITION MOYENNE DES NUCLEOTIDES LIBRES, DANS LE FOIE NORMAL, LE FOIE EN REGENERATION ET L'HEPATOME DE ZAJDELA APRES ET SANS RX.

(Valeurs exprimées en µmoles par g de protéides)

	FOIE NORMAL	FOIE EN REGENERATION	HEPATOME DE ZAJDELA	HEPATOME DE ZAJDELA APRES RX
Nombre d'expériences	6	5	5	3
AMP	2,16 ± 0,57	2,96 ± 0,58	0,76 ± 0,69	—
ADP	5,02 ± 0,67	4,72 ± 0,55	3,54 ± 1,41	1,42 ± 1,49
ATP	12,05 ± 2,01	5,75 ± 1,25	14,0 ± 2,02	16, 6 ± 5,63
NAD	2,43 ± 0,65	2,10 ± 0,75	0,93 ± 0,33	1,33 ± 0,71
NADP	0,825 ± 0,31	0,89 ± 0,16	0,205 ± 0,124	0,24 ± 0,1
IMP	1,03 ± 0,39	1,07 ± 0,14	0,89 ± 0,51	2,0 ± 0,83
CMP	0,32 ± 0,22	0,50 ± 0,57	2,05 ± 1,09	2,6 ± 1,19
CTP	0,79 ± 0,28	traces	2,54 ± 0,31	—
GMP	0,51 ± 0,24	0,42 ± 0,31	0,44 ± 0,16	0,54 ± 0,14
GTP	1,51 ± 0,32	1,00 ± 0,28	4,13 ± 1,0	4,60 ± 1,57
UMP	0,97 ± 0,29	1,54 ± 0,39	0,94 ± 0,40	0,71 ± 0,32
UDP	0,71 ± 0,43	0,38 ± 0,51	—	—
UTP	1,29 ± 0,27	0,71 ± 0,11	2,96 ± 1,13	2,34 ± 0,32
coenzymes à UDP	4,26 ± 0,62	4,88 ± 0,50	2,65 ± 0,96	2,99 ± 0,46

la répartition des nucléotides exprimés en µ moles/g de protéides du foie normal à celle de l'hépatome ascitique montre une diminution d'AMP ($p < 0,01$) de phosphopyridine nucléotides et de coenzymes à uridine ($p < 0,02$) dans la tumeur. Cette dernière est également plus riche que le foie normal en GTP et CTP.

Quand on compare les résultats obtenus pour l'ascite de Zajdela et ceux du foie en régénération on constate qu'il y a plus d'ATP, de CTP, de GTP et d'UTP ($p < 0,01$) mais moins de coenzymes à uridine ($p < 0,01$) et de pyridine nucléotides ($p < 0,02$) dans la tumeur que dans le foie en régénération.

Les cellules d'ascite après irradiation aux RX comparées au foie en régénération dénotent une richesse plus grande en CMP ($p < 0,02$), IMP ($p < 0,05$), ATP ($p < 0,01$), GTP ($p < 0,01$) et UTP ($p < 0,01$) et une pauvreté en NADP, AMP, ADP et UMP ($p < 0,01$). Ajoutons à cela des quantités très appréciables de TTP dans des cellules ascitiques après irradiation.

L'étude comparée du foie normal et du foie en régénération montre une quantité plus forte d'AMP ($p < 0,05$), d'UMP ($p < 0,05$) en même temps que des quantités plus faibles d'ATP ($p < 0,01$) et de GTP ($p < 0,05$) dans le foie en régénération.

Dans le tableau (7) nos résultats sont exprimés en pour cent de la totalité des nucléotides. La teneur en nucléotides cytidyliques et guanyliques de l'hépatome de Zajdela est supérieure à celle du foie normal ou en régénération ($p < 0,05$). Il en est de même pour les nucléotides adényliques si l'on compare le foie normal et le foie en régénération ($p < 0,05$) sans qu'il y ait de différence significative avec l'hépatome ascitique. La part des nucléotides uridyliques dans la totalité des nucléotides libres est bien plus élevée dans le foie en régénération que dans le foie normal ou l'hépatome ascitique.

Notons également (voir tableau 8) que la part ATP dans la totalité des nucléotides adényliques est plus élevée dans l'hépatome de Zajdela que dans le foie normal ou le foie en régénération. Le taux d'ATP ($p < 0,05$) s'accroit encore après irradiation aux RX de l'animal porteur d'ascite. Il en est de même pour le GTP, UTP et le CTP. Pour ce dernier en raison de la dispersion des résultats, le calcul statistique ne fait pas apparaître de différence significative. Mais la différence est réelle puisque les valeurs les plus faibles sont très supérieures à celles des hépatocytes normaux. A l'opposé la part des nucléotides uridyliques est plus faible dans l'hépatome de Zajdela irradié ou non, comparé au foie normal ou en régénération.

En ce qui concerne les pyridinenucléotides (tablau 9), quelle que soit la base de référence adoptée, on trouve moins de NAD et de $NADH_2$ dans l'hépatome que dans le foie. La différence est faible mais significative ($p < 0,01$) ; elle est considérable si l'on rapporte les valeurs

TABLEAU 7

REPARTITION MOYENNE ~~EN~~ DE L'ENSEMBLE DES NUCLEOTIDES LIBRES DU FOIE NORMAL, DU FOIE EN REGENERATION ET DE L'HEPATOME DE ZAJDELA APRES ET SANS RX.

(Valeurs exprimées en pour cent de la totalité).

	Foie normal	Foie en régénération	Hepatome de Zajdela	Hépatome de Zajdela après RX
Nombre d'expériences	6	5	5	3
somme des nucléotides à adénine	56,8 ± 3,88	49,7 ± 5,12	52,0 ± 5,97	50,8 ± 3,76
somme des phophopyridine-nucléotides	9,6 ± 2,05	11,0 ± 7,34	3,2 ± 8,20	4,5 ± 2,15
somme des nucléotides à cytidine	2,1 ± 3,86	2,7 ± 2,08	10,2 ± 2,3	7,3 ± 3,23
somme des nucléotides à guanine	6,2 ± 1,19	5,0 ± 1,37	13,3 ± 2,7	14,5 ± 3,76
somme des nucléotides à uridine	21,7 ± 2,86	27,6 ± 2,46	18,7 ± 3,82	17,1 ± 1,44
IMP	3,0 ± 0,99	4,0 ± 2,35	2,6 ± 6,7	5,7 ± 2,56

TABLEAU 8

REPARTITIONS MOYENNES D'UN GROUPE DE NUCLEOTIDES D'UNE MEME BASE DANS LE FOIE NORMAL, LE FOIE EN REGENERATION ET L'HEPATOME DE ZAJDELA APRES ET SANS RX.

(Valeurs exprimées en pour cent).

	Foie normal	Foie en régénération	Hépatome de ZAJDELA	Hépatome de ZAJDELA après RX
Nombre d'expériences	6	5	5	3
AMP	11,2 ± 2,34	22,4 ± 5,46	4,0 ± 2,64	0
ADP	26,3 ± 2,79	35,3 ± 2,29	18,7 ± 4,84	7,6 ± 7,18
ATP	62,5 ± 4,5	42,3 ± 5,54	77,3 ± 7,7	92,4 ± 7,18
NAD	73,8 ± 5,56	68,9 ± 6,36	80,6 ± 14,5	84 ± 5,64
NADP	26,2 ± 5,38	31,1 ± 6,46	19,4 ± 14,3	16,0 ± 4,92
CMP	64,25 ± 13,3	-	52,5 ± 43,5	-
CTP	35,75 ± 13,3	-	47,5 ± 43,6	-
GMP	26,9 ± 7,08	29,2 ± 23,3	9,6 ± 3,94	11,7 ± 6,12
GDP	-	-	3,5 ± 5,62	-
GTP	73,1 ± 8,9	70,8 ± 23,6	86,9 ± 7,82	88,3 ± 6,38
UMP	13,4 ± 3,4	20,4 ± 4,17	14,7 ± 5,22	11,8 ± 5,56
UDP	9,9 ± 6,06	4,0 ± 4,32	-	-
UTP	17,8 ± 3,08	9,8 ± 7,9	44,3 ± 11,1	38,9 ± 2,57
coenzymes à UDP	58,9 ± 6,6	65,8 ± 5,63	41,0 ± 8,02	49,3 ± 5,34

à l'ADN. Dans ce cas les quantités respectives de NAD, $NADH_2$ et NADP + $NADPH_2$ ne représentent que 14%, 17%, 12% de celles du foie, alors que par rapport aux protéides la réduction est de 43%, 28% et 49% seulement. Ajoutons que nous n'observons (tableau 10) pas de différence significative ($p > 0,05$) entre le taux de phosphopyridinenucléotides du foie de rats porteurs de l'hépatome de Zajdela et les taux des mêmes coenzymes dans le tissu hépatique normal. L'injection de nicotinamide qui provoque dans le foie une augmentation de NAD et $NADH_2$, NADP + $NADPH_2$ de 369%, 186%, 85%, produit dans les cellules tumorales un accroissement moyen de 34%, 47% et 44% seulement (tableau 11).

c) *Etude de l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les nucléotides adényliques libres de l'hépatome de Zajdela et du foie chez le même animal*

L'étude de l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les nucléotides adényliques (12 et 13) révèle qu'au bout de 24 heures l'équilibre de marquage isotopique est atteint: les activités spécifiques de nucléotides à adénine sont similaires aussi bien pour ceux du foie que pour ceux de l'hépatome et voisins de l'activité spécifique du P inorganique pour ce dernier. Il n'en est pas de même pour les périodes plus courtes, de 30 minutes et 1 heure. Pour ces derniers délais nous avons évalué l'AS des différents P des nucléosides triphosphates, en rapportant les valeurs au précurseur PO'''_4.

Les AS du Pα, Pβ, Pγ ont été calculées d'après l'AS de l'AMP, ADP et ATP en posant AS AMP = AS Pα, AS ADP = $\frac{ASP\alpha + ASP\beta}{2}$

$$ASATP = \frac{AS\ P\alpha + AS\ P\beta + AS\ P\gamma}{3}$$

Dans ces conditions deux faits apparaissent tout d'abord. L'activité spécifique relative est plus élevée dans la tumeur pour le temps le plus court; la différence s'atténue évidemment pour les délais plus longs où le nombre de cycles métaboliques qui interviennent est plus important. Ces résultats semblent donc bien en accord avec les faits que l'intensité de synthèse d'ATP est plus grande dans la tumeur. Ce même phénomène ressort si l'on compare l'AS du Pγ et du Pα; l'écart est beaucoup plus considérable dans les deux délais pour la tumeur que pour le foie; on a respectivement 10,6 contre 2,95 à 30 minutes et 4,25 contre 12,6 au bout d'une heure.

Ainsi l'étude cinétique s'avère en bon accord avec les données quantitatives qui reflètent l'état stationnaire en confirmant l'ajustement de synthèse des nucléosides triphosphates à un niveau plus élevé d'ARN. Nos résultats montrant l'égalisation des AS AMP, AS ADP et AS ATP dans le foie et la tumeur après 24 heures sont en accord avec ceux de Horie (178) où l'équilibre de marquage au $^{32}PO_4'''$ des nucléotides est atteint après 3 heures, si l'injection de

TABLEAU 9

COMPARAISON DE LA TENEUR EN DI ET TRIPHOSPHOPYRIDINE NUCLEOTIDES DE FOIES NORMAUX ET DE CELLULES ASCITIQUES DE ZAJDELA.

Les valeurs sont exprimées en mg de pyridines nucléotides par:
A: g de protéides
B: g de poids sec
C: mg de P ADN

	tissu	Nombre d'exp.	NAD	$NADH_2$	NAD + $NADH_2$	NADP + $NADPH_2$
A	Foie	4	2,78 ± 0,70	1,00 ± 0,21	3,79 ± 0,67	1,31 ± 0,25
	tumeur	4	1,58 ± 0,16	0,72 ± 0,08	2,30 ± 0,14	0,67 ± 0,20
B	Foie	4	2,16 ± 0,51	0,78 ± 0,14	2,94 ± 0,52	1,01 ± 0,21
	tumeur	4	1,32 ± 0,11	0,60 ± 0,07	1,92 ± 0,09	0,56 ± 0,16
C	Foie	4	2,86 ± 0,41	1,10 ± 0,21	3,96 ± 0,46	1,44 ± 0,27
	tumeur	4	0,41 ± 0,05	0,19 ± 0,04	0,60 ± 0,07	0,17 ± 0,06

TABLEAU 10

COMPARAISON DE LA TENEUR EN DI ET TRIPHOSPHOPYRIDINE NUCLEOTIDES DANS LE FOIE NORMAL ET LE FOIE DE RAT PORTEUR DE L'HEPATOME DE ZAJDELA.

(Les valeurs sont exprimées en mg de pyridine nucléotides par gramme de poids frais de foie).

~~Normal~~

	Nombre d'expérience	NAD	$NADH_2$	NAD+$NADH_2$	NADP+$NADPH_2$
Foie normal	4	0,430±0,063	0,165±0,033	0,595±0,068	0,216±0,045
Foie d'animaux porteurs de l'hépatome de Zajdela	6	0,365±0,072	0,120±0,033	0,485±0,080	0,154±0,013

TABLEAU 11

INFLUENCE D'UNE INJECTION DE NICOTINAMIDE (50 mg / 100g de poids corporel) SUR LES PYRIDINENUCLEOTIDES DU FOIE ET DE L'HEPATOME DE ZAJDELA.

Les valeurs expriment le quotient:

$$\frac{\text{Pyridinenucléotides des animaux recevant de la nicotinamide}}{\text{Pyridinenucléotides des animaux témoins}}$$

	Nombre d'expérience	NAD	$NADH_2$	NAD+$NADH_2$	NADP+$NADPH_2$
Foie normal	7	4,62±1,99	2,86±0,97	3,92±1,12	1;85±1,09
Hépatome de Zajdela	7	1,34±0,17	1,47±0,77	1,37±0,32	1,44±0,37

TABLEAU 12

AS DES NUCLEOTIDES LIBRES A ADENINE DANS LE FOIE ET L'HEPATOME CHEZ LES MEMES ANIMAUX APRES INJECTION DE $^{32}PO_4'''$ A DES DELAIS VARIABLES AVANT LE SACRIFICE.

N°	Tissu	Durée	dose $^{32}PO_4'''$ par 100g corporel	AS PO_4'''	AS AMP	AS ADP	AS ATP
1	Ascite Foie	30 mn	200 µc	111 368	10 68	58 129	74 153
2	Ascite Foie	1 h.	200 µc	1707 3012	344 1800	911 2200	1093 2225
3	Ascite Foie	24 h.	100 µc	75 53	82 73	77 67	76 80

TABLEAU 13

AS ET ASR DES Pα, Pβ, Pγ, DES NUCLEOTIDES ADENYLIQUES DANS LE FOIE ET L'HEPATOME DE ZAJDELA CHEZ LES MEMES ANIMAUX APRES INJECTION DE $^{32}PO_4'''$ 30 ET 60 MINUTES AVANT LE SACRIFICE.

N° Exp.	Tissu	AS Pα	AS Pβ	AS Pγ	ASR Pα	ASR Pβ	ASR Pγ	$\frac{ASP\gamma}{ASP\alpha}$	$\frac{ASR\ Ascite}{ASR\ Foie}$ Pα	Pβ	Pγ
1 (30 mn)	Ascite Foie	10 68	107 190	106 201	0,09 0,18	0,96 0,51	0,95 0,41	10,6 2,95	0,50	1,88	2,32
2 (60 mn)	Ascite Foie	344 1800	1478 2600	1457 2275	0,20 0,59	0,86 0,86	0,86 0,75	4,25 1,26	0,34	1,0	1,14

l'isotope a été faite par voie intrapéritonéale. Les valeurs voisines de l'AS pour le Pβ et Pγ que nous avons constatées aux délais courts concordent avec les résultats de Brumm et collaborateurs (47) pour le même organe. Elles témoignent d'une activité myokinasique assez forte. Il est intéressant de noter que nous retrouvons le même phénomène dans l'hépatome, montrant que dans les cellules tumorales cette activité myokinasique est également intense.

5° CONCLUSIONS.

L'ensemble des données concernant les nucléotides libres que nous venons d'exposer révèle une similitude à côté des différences fondamentales. La similitude est le maintien de la répartition du type métabolique dans le foie à l'état stationnaire, dans le foie en régénération et dans l'hépatome. Rappelons que Schmitz (339) propose de distinguer deux types de distribution de nucléotides libres: le type énergétique et le type métabolique. Le premier type est caractérisé par la

prédominance des nucléotides adényliques. On le trouve dans le muscle. Le deuxième type se distingue par la présence d'un taux relativement élevé de nucléotides guanyliques, cytidyliques et uridyliques et en particulier des nucléosides diphosphates complexes. Le foie et le pancréas entrent dans cette catégorie.

Cependant si l'hépatome garde un diagramme de nucléotides du type métabolique, des différences notables les distinguent du foie normal et du foie en régénération. En effet, comme dans les organes à grande dépense énergétique, où s'effectue un ajustement en faveur des nucléotides adényliques, on observe, dans la tumeur, des taux particulièrement élevés en nucléosides triphosphates. Ajoutons à cela la présence dans l'hépatome de Zajdela des désoxyribonucléotides qui fournissent les précurseurs pour les synthèses d'ADN.

L'analyse des résultats nous renseigne également sur une autre régulation, non moins importante que l'accumulation ~~du taux~~ des nucléosides triphosphates dans les cellules de l'hépatome.

On note en effet aussi bien dans le foie normal que dans le foie en régénération des valeurs d'UDP coenzymes beaucoup plus élevées que dans la tumeur. Or, ces nucléotides interviennent dans certaines fonctions spécialisées, telle la synthèse des membranes intracellulaires. Un taux faible de ces composés laisse pressentir des troubles dans la synthèse de ces membranes.

L'ensemble des faits suggère une hypothèse qui est en parfait accord avec les nombreux phénomènes caractéristiques de la cellule cancéreuse rapportés jusqu'à présent, et qui est susceptible de les expliquer. Cette hypothèse est schématisée dans la figure 7.

Nous pensons que, dans la cellule cancéreuse en prolifération, s'opère un ajustement de nucléosides triphosphates aux synthèses intenses d'ARN et qui aboutit à un pool riche en nucléosides polyphosphates. Cependant la synthèse des nucléosides triphosphates est restreinte par des réactions à facteurs limitants comme on en connaît dans divers cycles métaboliques, en particulier celui de la dégradation de glucides. Ainsi on a décrit dans le cristallin et le cerveau que l'hexokinase est un facteur limitant. Ceci est particulièrement vraisemblable dans les cellules cancéreuses où il y a prédominance de glycolyse, voie métabolique qui forme relativement peu d'ATP.

On s'explique dès lors que, parallèlement à l'utilisation intense des nucléosides triphosphates pour la synthèse de l'ARN, la formation de nucléosides diphosphatecoenzymes à partir de ces mêmes nucléosides triphosphates se trouve réduite, comme en témoignent les résultats expérimentaux. Autrement dit, le facteur, à présent inconnu, qui stimule la prolifération dans la cellule cancéreuse, produit un effet indirect: la diminution des nucléosides diphosphates complexes indispensables pour les fonctions métaboliques spéciales de la cellule hépatique. Parmi ces réactions citons la synthèse des polysaccharides,

des glucuroconjugués, des phosphatides, ainsi que la formation des structures membraneuses. On retrouve sur le plan morphologique le reflet de la régulation de l'utilisation de nucléotides que nous venons d'exposer. En effet, parallèlement au déclenchement de la prolifération tumorale on met en évidence une réduction du système membranaire intracellulaire. Sur le plan métabolique on trouve également un parallélisme entre la multiplication à caractère tumoral et l'installation d'une glycolyse, qui semble être la conséquence de lésions membranaires des mitochondries dont le nombre est inférieur dans les tumeurs comparées aux tissus normaux. Il semble donc judicieux de considérer la distribution des nucléotides que nous avons trouvée comme manifestation de régulation, susceptible d'expliquer l'apparition simultanée de la prolifération tumorale et de la dédifférentiation des cellules cancéreuses.

Ajoutons que sous l'effet des RX on constate, dans l'hépatome de Zajdela, parallèlement au bloquage temporaire de la synthèse d'acides nucléiques (250 - 251) une accumulation des nucléosides triphosphates. Nos constatations sont en accord avec les résultats d'Ord (293 - 294), de Bishop (31) sur le thymus.

Notre hypothèse est en bon accord avec les faits concernant le foie en régénération. Ce dernier possède des cellules qui se multiplient mais qui donnent des cellules filles parfaitement différenciées. Le pool des nucléosides triphosphates se trouve donc épuisé par l'utilisation simultanée dans deux directions de synthèse, celle de l'ARN et celle de nucléosides diphosphates coenzymes. On pourrait se demander si ce n'est pas précisément cet épuisement de pool de nucléosides triphosphates qui freine progressivement la prolifération jusqu'à son arrêt. Rappelons que c'est l'arrêt de la prolifération qui distingue l'hyperplasie normale de la prolifération cancéreuse.

Notons également qu'un taux élevé de certains nucléosides triphosphates dans les cellules cancéreuses a été signalé (327 - 336) auparavant, mais comme nous l'avons indiqué, la comparaison porte sur des cellules de caractères morphologiques différents. De plus, le prélèvement du tissu normal était effectué dans de mauvaises conditions expérimentales; les valeurs des nucléosides triphosphates du foie qui servaient de référence étaient très inférieures à ce que nous avons trouvé, au point que la différence observée était le résultat d'erreurs parallèles dans le dosage des cellules normales et tumorales. La baisse de coenzymes à uridine signalée par Schmitz (334) dans une tumeur ascitique, a été constatée contemporairement à notre travail par Nodes et Reid (289) dans un hépatome induit au diméthylazobenzène.

Nos résultats sont à rapprocher de ceux de Gregoire et collaborateurs (147 - 148 - 149). Ces auteurs ont trouvé d'importantes quantités d'uridine diphosphates conjugués aux oses dans la glande thyroïde, alors qu'ils n'ont pas trouvé d'UTP. Or, on sait que le tissu thyroïdien hautement différencié synthétise principalement des glycoprotéides.

En ce qui concerne les pyridinenucléotides dans les cellules tumorales, le taux faible que nous y avons trouvé confirme de nombreux travaux (28 - 62 - 63 - 64 - 112 - 134 - 388 - 389), quoiqu'il y ait eu des auteurs comme von EULER (108) qui n'ont pas vu de variation de NAD dans le sarcome de JENSEN comparé au muscle. Mais ces auteurs n'avaient à leur disposition que des techniques non spécifiques ou faisaient des déterminations totales de pyridinenucléotides ou comparaient des cellules non homologues. C'est WEINHOUSE (191 - 192 - 395 - 398), dans ses travaux sur le NAD et NADP des mitochondries tumorales, qui souligna la dépendance de la glycolyse [dont l'importance a été montrée par WARBURG (390 - 391)] avec le faible taux de phosphopyridinenucléotides. C'est «l'effet DPN» de WEINHOUSE, différence métabolique fondamentale entre le tissu normal et les cellules cancéreuses.

La diminution de NAD ne semble pas être due à l'augmentation de la phosphopyridinenucléotidase [QUASTEL et ZATMANN (312)], mais plutôt à la diminution de l'activité NAD pyrophosphorylasique cellulaire d'après BRANSTER et MORTON (38). BORST (36), (37) expérimentant sur les mitochondries de cellules ascitiques trouve que les mitochondries tumorales sont plus riches en NAD que celles du foie normal si les valeurs sont rapportées aux protéines. Ces résultats nous semblent contradictoires qu'en apparence, si on se souvient que la cellule tumorale est pauvre en mitochondries (210). La cellule cancéreuse entière peut avoir un taux de pyridinenucléotides inférieur à celui de la cellule normale tout en ayant un système mitochondrial très peu développé mais très riche en NAD. Rappelons que la biosynthèse du NAD se réalise entièrement dans le noyau [HOGEBOOM (172)] et que ce coenzyme est utilisé par des enzymes cytoplasmiques. Par ailleurs les valeurs des métabolites rapportées à l'ADN, élément constant de chaque cellule (245 - 33), même s'il y a de sévères perturbations métaboliques, constitue la meilleure évaluation pour la confrontation des résultats. Comme l'hépatome de ZAJDELA contient plus d'ADN par noyau que le foie normal, la modification de l'équilibre cellulaire apparaît encore d'une façon plus significative, en ce qui concerne les phosphopyridinenucléotides dans la cellule tumorale comparée à la cellule normale homologue.

L'administration de nicotinamide [bonne technique décrite par KAPLAN et collaborateurs (196 - 195), pour l'étude d'une synthèse stimulée de NAD accompagnée de synthèse de purines (221 - 350)] à des rats normaux et à des animaux porteurs de l'hépatome de ZAJDELA montre la déficience de la néosynthèse de NAD de l'hépatome ascitique par rapport à celle du foie normal. Ceci prouve que la cellule ascitique en prolifération constante, utilise préférentiellement son adénine disponible non pour la synthèse du NAD mais, pour celle de nucléotides adényliques des acides nucléiques.

TABLEAU 14

EFFET D'UNE SYNTHESE DE PYRIDINENUCLEOTIDE INDUITE IN VIVO SUR LE METABOLISME DE L'ARN DE L'HEPATOME DE ZAJDELA.

Les valeurs expriment le rapport moyen N/T de L'AS $PO_4^{'''}$ de L'ASR ARN, et du PARN par g de protéides dans le foie et dans l'hépatome.

T = animaux témoins; N = animaux ayant reçu 2 fois par jour 100mg par 100g de poids corporel pendant 5 jours de la nicotinamide par voie sous-cutanée.

	Nombre d'exp.	AS $PO_4^{'''}$	ASR ARN	P ARN/g protéides
Foie normal	9	1,38 ± 0,16	0,83 ± 0,10	0,91 ± 0,18
Hépatome de Zajdela	6	0,93 ± 0,05	1,06 ± 0,13	1,02 ± 0,14

COMPETITION ENTRE LA SYNTHESE D'ARN ET DE COENZYMES A NUCLEOSIDES DIPHOSPHATES INTERVENANT DANS LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE

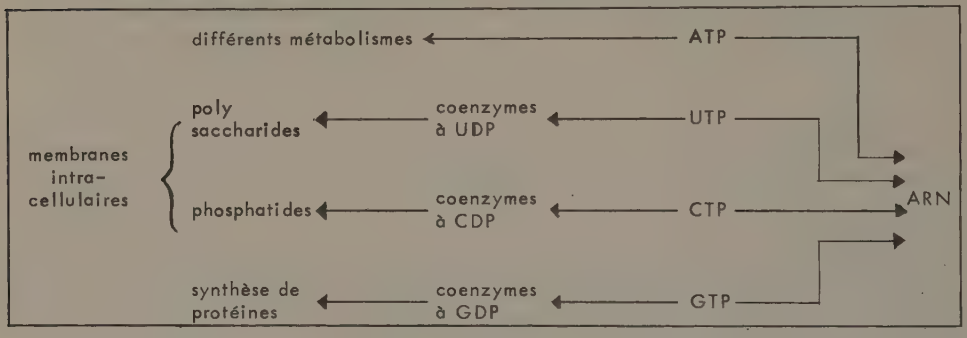


FIGURE 7

Nos résultats sont à rapprocher de ceux de Redetzki (315) et Sahasrabudhe (286 - 326) et Mascitelli (260). Les travaux de Holzer (176 - 218 - 219) et collaborateurs, consacrés à l'étude des carcinostatiques inhibiteurs de la glycolyse, ont montré que la nicotinamide a le pouvoir de bloquer l'effet inhibiteur des carcinostatiques en déclenchant une synthèse de NAD dans des cellules ascitiques.

Lors des divisions cellulaires normales, il y a augmentation de l'activité NAD pyrophosphorylasique qui provoque la synthèse de NAD, nécessaire à de nombreuses réactions permettant l'élaboration de nouveau cytoplasme. D'après Morton (275) il y aurait un mécanisme de rétrocontrôle du NAD qui commande la vitesse de divisions cellulaires. Cette vitesse diminue progressivement dans une cellule normale. Dans la cellule cancéreuse on assisterait à un dérèglement de ce mécanisme de rétrocontrôle où les multiplications cellulaires se font d'une manière incontrôlée par manque de phosphopyridinenucléotides.

D'après la théorie de Sahasrabudhe (326) l'appauvrissement en NAD de la cellule cancéreuse provoque l'hypofonctionnement du cycle des acides tricarboxyliques de Krebs, par une faible production d'énergie et une exaltation du cycle du hexose-monophosphate.

Une autre hypothèse formulée par Revel (318) et collaborateurs, celle de la compétition entre les synthèses de NAD et d'ARN a retenu notre attention (tableau 14). L'étude comparative de l'AS PO_4''' et de l'ASR ARN révèle une augmentation de l'AS PO_4''', ($p < 0{,}01$) et une diminution significative de l'ASR ARN ($p < 0{,}01$) dans le foie normal par rapport à l'hépatome de Zajdela sous l'effet d'une synthèse de pyridinenucléotide induite in vivo par un traitement intense à la nicotinamide. Remarquons que Revel (319) a constaté une inhibition du métabolisme de l'ARN plus importante, de l'ordre de 30%, dans le rein en voie d'hypertrophie. La différence de réponse du foie de rat normal avec le rein normal, à l'action de la nicotinamide sur le métabolisme de l'ARN peut s'expliquer si l'on tient compte du rôle physiologique du foie dans les phénomènes de détoxication. La nicotinamide administrée subit sans doute en partie les phénomènes de méthylation, ce qui réduit l'effet de ce composé sur le métabolisme de l'ARN. La différence de comportement du foie et du rein normal après administration de nicotinamide peut aussi résulter de la différence de richesse en ATP des deux types de cellules: le foie étant plus riche en ATP que le rein. Or, il est bien établi que la biosynthèse de NAD est liée aux variations de l'ATP (30 - 216 - 217 - 321). En ce qui concerne les cellules ascitiques riches en ATP et pauvres en NAD, il semble qu'elles ont conservé au moins partiellement leur fonction de cellule différenciée tout en proliférant rapidement. L'effet inhibiteur de la nicotinamide sur le métabolisme de l'ARN est très attenué. Notons qu'il reste à vérifier expérimentalement que l'hépatome de Zajdela a gardé la fonction de détoxication. Il semble même que la présence de tumeur maligne touche les méthylations chez l'organisme hôte en provoquant une déficience de donneurs de groupements méthyles (1 - 377).

Signalons que De Burgh (49) constate une diminution de NAD dans le foie en régénération où comme on sait les synthèses d'acides nucléiques sont accrues. Dans le métabolisme de la cellule à croissance normale, il y a inhibition de la biosynthèse de l'ARN quand celle du NAD est stimulée; par contre dans la cellule tumorale, constamment en prolifération, la néosynthèse de NAD est moins exaltée: les groupements adényliques disponibles sont utilisés préférentiellement pour la biosynthèse de l'ARN. L'équilibre de ce mécanisme de régulation ARN - NAD diffère dans les deux types de croissance: dans la cellule hépatique normale, quand le stade adulte est atteint la synthèse de NAD est intense, tandis que celle de l'ARN est faible. Inversement dans le cas de l'hépatome, la synthèse de NAD est peu élevée alors que le métabolisme intense de l'ARN favorise la multiplication cellulaire.

Ainsi il apparaît que la synthèse de NAD à partir de la nicotinamide et d'ATP ~~sont~~ *est* impliquée dans un mécanisme de régulation de la synthèse d'ARN qui fonctionnerait différemment pour les tissus à croissance normale et pour les tumeurs qui ont une croissance anarchique.

II. — RÉGULATION A L'ECHELLE CELLULAIRE.

BIOSYNTHESE DES ARN DU NOYAU DE FOIE ET DE L'HEPATOME DE ZAJDELA.

A. — *Etude comparée de l'ARN nucléaire global du foie et de l'hépatome de* ZAJDELA.

1° ETUDE DU RAPPORT ARN/ADN DU NOYAU DE FOIE ET DE L'ASCITE DE ZAJDELA.

Avant d'aborder l'étude de marquage de l'ARN nucléaire du foie et de l'hépatome de Zajdela, nous avons jugé utile de déterminer d'une part le rapport ARN/ADN et d'autre part la composition en base de l'ARN du noyau.

Les valeurs trouvées pour le rapport ARN/ADN (voir tableau 15) ont été obtenues d'après les déterminations faites sur la fraction nucléaire, sans isolement préalable des acides nucléiques. Il en ressort que le noyau de la cellule cancéreuse a un rapport ARN/ADN plus élevé que celui de la cellule homologue normale. En tenant compte d'une part de la plus grande quantité d'ADN par noyau tumoral [voir aussi (290)] comparé au noyau hépatique normal et du rapport élevé ARN/ADN du noyau de l'hépatome, d'autre part, on constate la grande richesse du noyau de tumeur en ARN autant qu'en ADN. Ainsi à la notion déjà acquise du contenu élevé en ARN des cellules cancéreuses il convient d'ajouter celle du noyau.

2° CONSTITUTION DE L'ARN NUCLEAIRE DU FOIE ET DE L'HEPATOME DE ZAJDELA.

L'analyse qualitative de l'ARN nucléaire total (voir tableau 16) nous révèle des différences significatives entre les deux types de cellules étudiées: l'ARN nucléaire tumoral est plus riche en AMP et UMP que l'ARN du noyau de foie sain et moins riche en CMP. Ceci se traduit

par un rapport CMP + GMP/AMP + UMP diminué pour l'hépatome en comparaison avec celui du foie. L'ARN nucléaire total du foie à un rapport CMP + GMP/AMP + UMP très voisin de celui que nous avons trouvé pour l'ARN de la cellule entière où prédomine l'ARN de type ribosomique. L'ARN du noyau de l'hépatome accusant une baisse du rapport CMP + GMP/AMP + UMP possède une valeur intermédiaire entre celle de l'ARN ribosomique (1,4) et celle trouvée pour l'ADN (0,75) (voir tableau 17). Serait-ce l'indice de l'existence d'un ARN à composition voisine de l'ADN, dans le noyau hépatique cancéreux, en quantité plus appréciable que dans le foie? L'on sait, depuis les travaux des deux dernières années, toute l'importance d'un tel ARN (129 - 354).

3° ETUDE DU MARQUAGE DE L'ARN NUCLEAIRE PAR LE $^{32}PO_4'''$ «IN VIVO».

a) *Préparation* (voir partie Méthodes).

b) *Chromatographie de l'ARN nucléaire.*

Nous avons employé la méthode de chromatographie sur colonne d'albumine méthylée de préférence à l'ultracentrifugation en gradient de saccharose, car elle offre l'avantage d'une séparation plus nette des ARN et des molécules d'ADN plus ou moins dégradées par l'action de la DNAse. En effet, après la digestion DNAsique une partie du matériel désoxyribonucléique coprécipite avec l'ARN. Les détails techniques ont été rapportés dans la partie Méthodes. Nous avons vérifié dans nos conditions que l'ADN s'éluait dans les fractions les plus précoces: jusqu'à la fraction 80 environ (voir figures 8 et 9). De même l'interprétation de courbes de radioactivité n'est pas sujet à des erreurs en raison de la présence des petites quantités d'ADN, car l'activité spécifique globale de ce dernier est très inférieure à celle de l'ARN (voir tableau 18) même sans purification préalable, conditions dans lesquelles l'ADN contient encore des quantités appréciables de radioactivités de provenance ribonucléique.

Disons aussi que l'ARN nucléaire extractible par la technique au phénol en présence de détergent, a une activité spécifique nettement inférieure à celle de la fraction d'ARN qui reste dans l'interphase (voir tableau 19). Nos résultats sont à rapprocher de ceux de Yamana (404) et Sibatani (354) et collaborateurs qui ont signalé les premiers la présence d'une fraction d'ARN à renouvellement particulièrement intense, non extractible par la méthode au phénol, puis ceux de Monier (269) et Scott et collaborateurs (351). Il faut ajouter que Sibatani n'ayant pas utilisé de détergent associé au phénol et Monier ayant opéré sur des cellules entières il convenait de préciser dans quelle mesure la présence de détergent modifie le rapport des AS ARN extrait par le phénol et restant de l'AS ARN dans l'interphase, quand il s'agit seulement des noyaux.

TABLEAU 15

COMPARAISON DU TAUX D'ARN DANS LES NOYAUX DU FOIE NORMAL ET DE L'HEPATOME DE ZAJDELA

	ADN par noyau 10^{-6} µg	$\frac{ARN}{ADN}$ du noyau
FOIE	0,83 ± 0,01	0,18 ± 0,03
HEPATOME DE ZAJDELA	1,63 ± 0,22	0,51 ± 0,06

TABLEAU 16

COMPARAISON DE LA COMPOSITION MOYENNE EN RIBONUCLEOTIDES DE L'ARN NUCLEAIRE DU FOIE DE RAT ET DE L'HEPATOME DE ZAJDELA.

(Les valeurs sont exprimées en molécules pour 100 molécules de nucléotides et sont suivies de la déviation standard).

$$\frac{Pu}{Py} = \frac{GMP + AMP}{CMP + UMP} \qquad \frac{6\ amino}{6\ céto} = \frac{AMP + CMP}{GMP + UMP}$$

	Nombre d'exp.	CMP	AMP	GMP	UMP	$\frac{Pu}{Py}$	$\frac{6\ amino}{6\ céto}$	$\frac{CMP+GMP}{UMP+AMP}$
Foie	5	30,6±1,1	18,7±0,8	29,0±1,5	21,7±0,27	0,91	0,97	1,48
Hépatome de Zajdela	6	27,3±1,1	20,8±1,3	28,15±2,2	23,75±1,6	0,95	0,93	1,28
test T de Fischer		p<0,01	p<0,02	p>0,05	p<0,02			

TABLEAU 17

COMPOSITION EN BASES DE L'ADN DU FOIE NORMAL ET DE L'HEPATOME DE ZAJDELA D'APRES ROSENBERG (323)

(Les valeurs sont exprimées en molécules pour 100 molécules de nucléotides, suivies de la déviation standard qui sont précédées du signe ±).

	C	A	G	T	$\frac{Pu}{Py}$	$\frac{6\ amino}{6\ céto}$	$\frac{C+G}{A+T}$
Foie normal	19,2 ± 0,39	28,8 ± 0,64	22,5 ± 0,61	29,5 ± 0,56	1,05	0,92	0,72
Hépatome de Zajdela	21,6 ± 0,26	28,8 ± 0,56	21,2 ± 0,45	28,4 ± 0,55	1,00	1,01	0,75

$$\frac{Pu}{Py} = \frac{G + A}{C + T} \qquad \frac{6\ amino}{6\ céto} = \frac{A + C}{G + T}$$

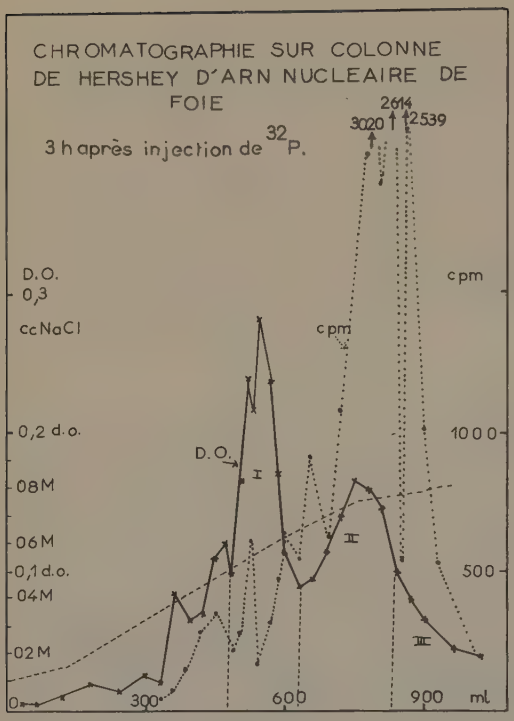


FIGURE 8

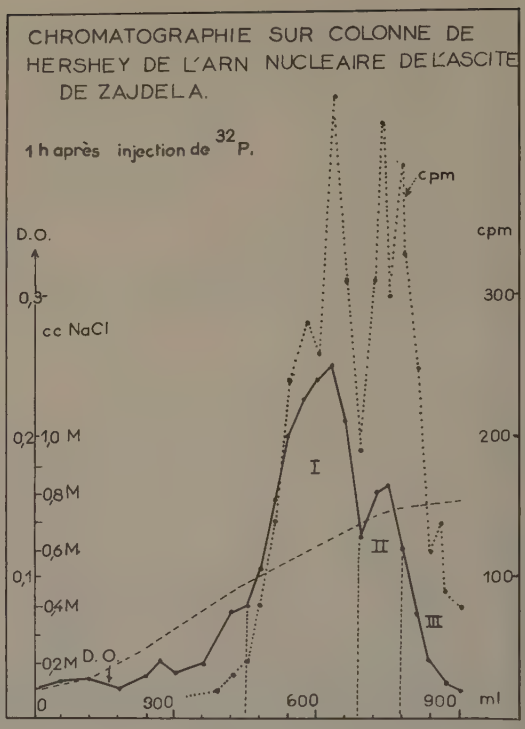


FIGURE 9

La différence entre ces deux types d'ARN se trouve confirmée par l'évolution du rapport des AS ARN extrait / AS ARN non extractible en fonction du temps de marquage. Cette différence est beaucoup plus considérable aux délais courts (30 minutes) qu'à des délais plus longs (1 heure) comme le montre les valeurs obtenues pour l'ascite (tableau 19). Les figures 8 et 9 montrent des chromatogrammes d'ARN nucléaire total du foie et de l'hépatome. Nous constatons que les deux diagrammes ne montrent pas de différence fondamentale du point de vue absorptions dans l'U.V.. Nous retrouvons essentiellement les deux types d'ARN lourd, de l'ordre de 20 S et de 30 S décrits pour les cellules animales (Philipson (301), Harshaw (161), Sporn (366) et leurs collaborateurs). Nous voyons que, même pour des temps de marquage courts, nous retrouvons une forte incorporation de radioactivité à ce niveau. Nous avons déterminé l'AS des deux pics d'ARN et de la fraction d'ARN correspondant à la branche descendante du deuxième pic (voir figures 8, 9 et tableau 20), endroit où apparaît une radioactivité importante. Nous constatons que ce sont les fractions les plus lourdes

TABLEAU 18

COMPARAISON DE L'AS ARN ET DE L'AS ADN DE LA FRACTION NUCLEAIRE EXTRACTIBLE PAR LA METHODE AU PHENOL.

(Les AS sont exprimées en cpm/µgP nucléique).

Origine des noyaux	temps de marquage	AS ARN	AS ADN
		de la fraction extractible par la méthode au phénol	
Foie	3 h	445	54
	3 h, chasse après 2h 30	710	81
Hépatome de Zajdela	1 h	345	79
	1 h	237	98

TABLEAU 19

COMPARAISON DE L'AS ARN DE LA FRACTION NUCLEAIRE EXTRACTIBLE ET DE L'AS ARN DE LA FRACTION NUCLEAIRE NON EXTRACTIBLE PAR LA TECHNIQUE AU PHENOL.

(Les AS ARN sont exprimées en cpm/µgP nucléique)

Origine des noyaux	temps de marquage	AS ARN Extrait	AS ARN non extractible
FOIE	3 h	445	4150
	3 h, chasse après 2h 30	710	2090
Ascite de Zajdela	30 mn	111	2690
	30 mn	191	2050
	1 h	217	1140
	1 h	237	1140

TABLEAU 20

AS ARN MOYENNES DES DIFFERENTES FRACTIONS D'ARN NUCLEAIRE ISOLEES SUR COLONNE D'ALBUMINE METHYLEE.

(Les activités spécifiques sont exprimées en cmp/µmole nucléotide)

Origine nucléaire	durée de marquage au $^{32}PO_4'''$	AS ARN pic 1	AS ARN pic 2	AS ARN fraction III
foie	30 mn	1050	835	1300
foie	3 h	1460	5420	14100
foie	6 h	1920	5000	3780
ascite	30 mn	835	1580	3800
ascite	1 h	620	1300	2640

qui sont le plus marquées. Il nous paraît prudent de ne pas pousser l'interprétation au-delà des faits généraux que nous rapportons. Il est en effet évident que les pics que nous relevons ne reflètent pas l'hétérogénéité réelle de la cellule. Nos techniques actuelles ne sont pas assez sensibles pour effectuer une séparation fine des différents types d'ARN d'une cellule. La localisation de la radioactivité obtenue est à rapprocher de celle obtenue par MONIER (270) et ISHIHAMA (186) et leurs collaborateurs sur E. COLI, par chromatographie sur colonne de HERSHEY (244). Ces auteurs ont démontré le caractère messager de la dernière fraction hautement radioactive par l'étude d'incorporation d'acides aminés et de formation de complexes avec des ribosomes.

Nos résultats sont en bon accord avec ceux obtenus à la même époque ou postérieurement à notre travail sur la cellule animale: CHENG (78) sur les cellules amniotiques humaines, SCHERRER (329) sur les cellules HeLa, GEORGIEV (131) sur de l'ascite d'Ehrlich, HIATT (167), HARRIS (159), HAREL (158), KIDSON (205) et COOLSMA (86) et leurs collaborateurs sur le foie et de REVEL (319) sur le rein; ces auteurs ont mis en évidence l'existence d'ARN à renouvellement très rapide et qui sédimente plus vite que l'ARN 30 S. Nous voyons que le marquage intense de la fraction III de l'ARN du noyau est très rapide car il est déjà bien apparent après 30 minutes autant dans le foie que dans l'hépatome. Elle se conserve jusque trois heures après l'injection de l'isotope radioactif dans le cas du foie. C'est après un délai de six heures que nous retrouvons dans le foie l'AS ARN du pic 2 plus élevé que celle de la fraction III.

B. — *Étude des noyaux entiers «in vitro».*

1° ETUDE DE L'INCORPORATION DES PRECURSEURS RADIOACTIFS DANS L'ARN NUCLEAIRE.

Pour préciser la vitesse de synthèse ou de renouvellement de l'ARN nucléaire, nous avons étudié ce phénomène au niveau de novaux isolés, *in vitro*. En travaillant sur un système biologique simplifié, on peut dégager avec plus de rigueur la rapidité de marquage et le sort des acides nucléiques.

Nous avons utilisé, comme précurseurs radioactifs, de l'adénine 8-C-14, de l'acide orotique 6-C-14 et du $^{32}PO_4'''$. Le milieu d'incubation utilisé dans nos essais sur les noyaux de foie et d'hépatome ascitique est celui de LOGAN (232) auquel nous ajoutons du polyvinylsulfate, inhibiteur de la ribonucléase. Dans les divers essais, nous avons opéré sur des quantités équivalentes de noyaux en se basant sur l'ADN. Les détails techniques ont été décrits ailleurs.

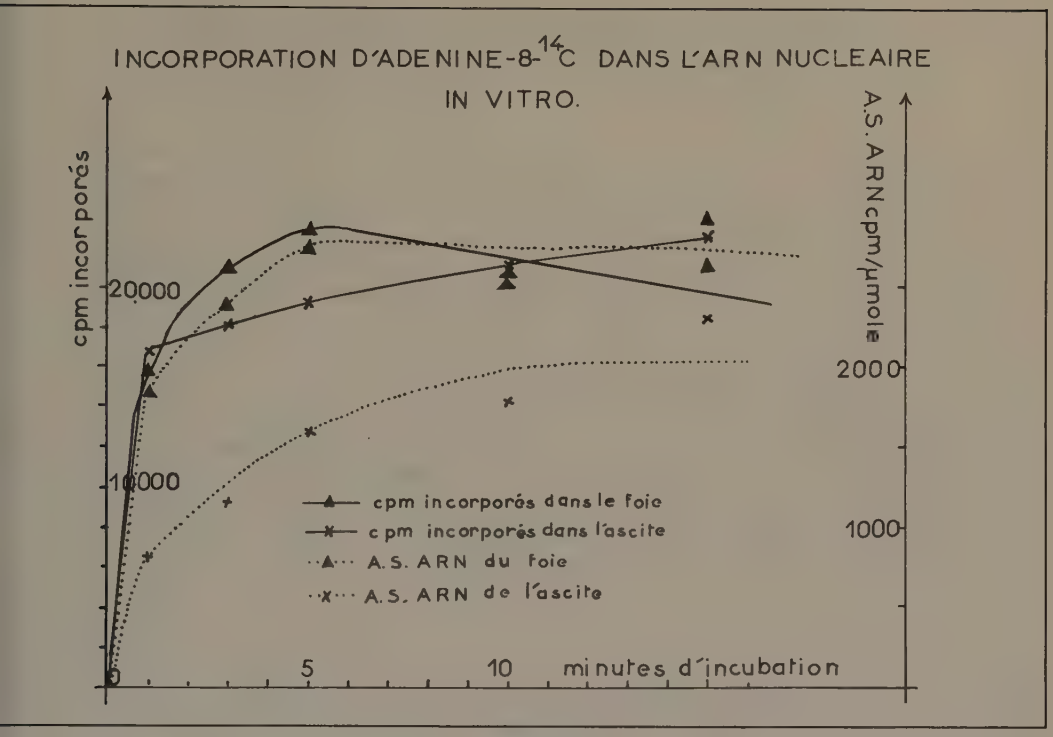


FIGURE 10

La figure 10 indique l'incorporation d'adénine 8-C-14 dans l'ARN nucléaire en fonction du temps d'incubation. Nous voyons que les deux types de noyaux hépatiques normaux et tumoraux ont un comportement similaire. Le marquage est extrêmement rapide pour les délais d'une minute, suivi de stabilisation progressive à partir de la première à la deuxième minute, puis d'incorporation plus lente voire d'équilibration au bout de 5 minutes. On remarque une diminution très nette de la pente de la courbe d'incorporation totale de radio-précurseur en fonction du temps et de celle des AS ARN en fonction de la durée d'incubation. Le fait que la courbe de l'AS ARN des cellules tumorales soit localisée au-dessous de celle des cellules hépatiques, peut s'expliquer par une activité RNA polymérasique plus faible que dans le foie normal trouvée par PETE et collaborateurs (298 - 253) d'une part, et par une plus grande richesse en ARN ribosomal du noyau de l'hépatome de ZAJDELA d'autre part, comme nous l'exposerons plus loin. L'incorporation précoce *in vitro* rend compte de la rapidité de la biosynthèse des ARN dans le noyau de foie et de l'hépatome semblable à celle enregistrée pour les bactéries. Elle n'apparaît pas si évidente quand on opère sur l'animal ou les cellules entières.

2° ETUDE DE LA MIGRATION D'ACIDES NUCLEIQUES DE NOYAUX INCUBES «IN VITRO».

a) *Etude quantitative.*

Nous avons recueilli le milieu dans lequel étaient incubés les noyaux *in vitro* et analysé les acides nucléiques qui y apparaissent. Nous avons constaté qu'une partie importante d'acides nucléiques quittait le noyau au cours de l'incubation. Des contrôles systématiques au microscope à contraste de phases n'ont pas montré d'agglutination ou de lyse nucléaire au cours des essais. Comme l'a signalé Revel (319) dans des expériences contemporaines des nôtres, on ne retrouve pas de grandes quantités d'ADN dans le milieu d'incubation.

La figure 11 représente la migration des acides nucléiques en fonction du temps, au cours de l'incubation de noyaux de foie et de noyaux de l'hépatome. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences en ce qui concerne le foie et de 4 expériences en ce qui concerne l'ascite. L'ARN que l'on retrouve dans le milieu d'incubation représente jusqu'à 45% de l'ARN nucléaire total, l'ADN environ à 5%

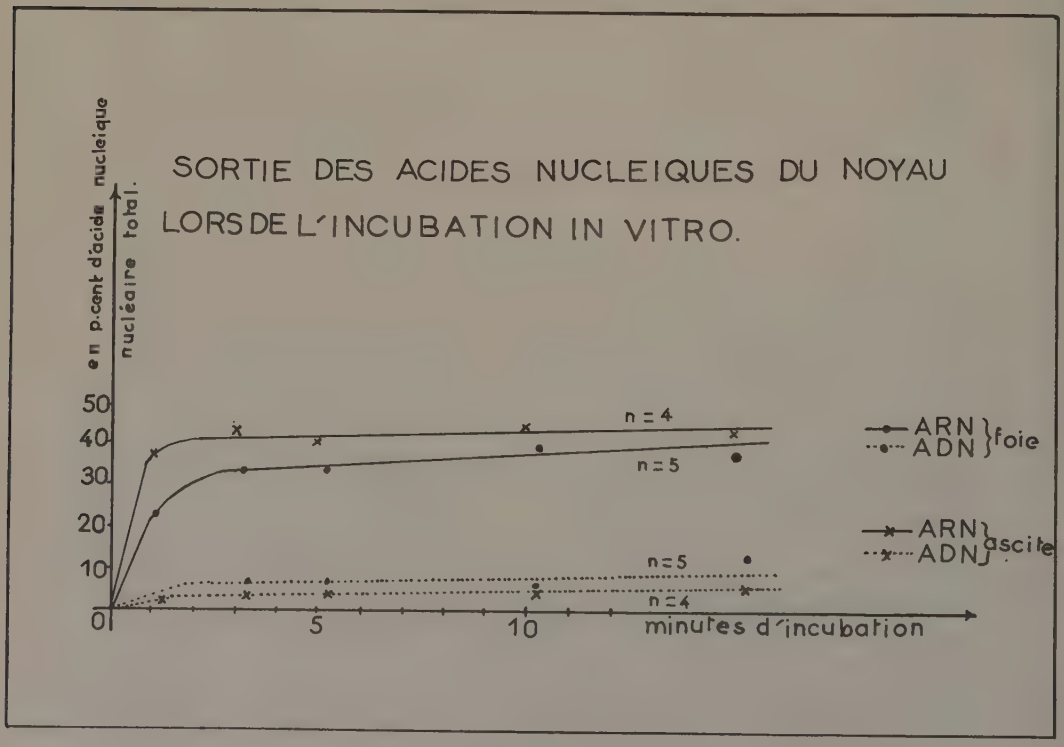


FIGURE 11

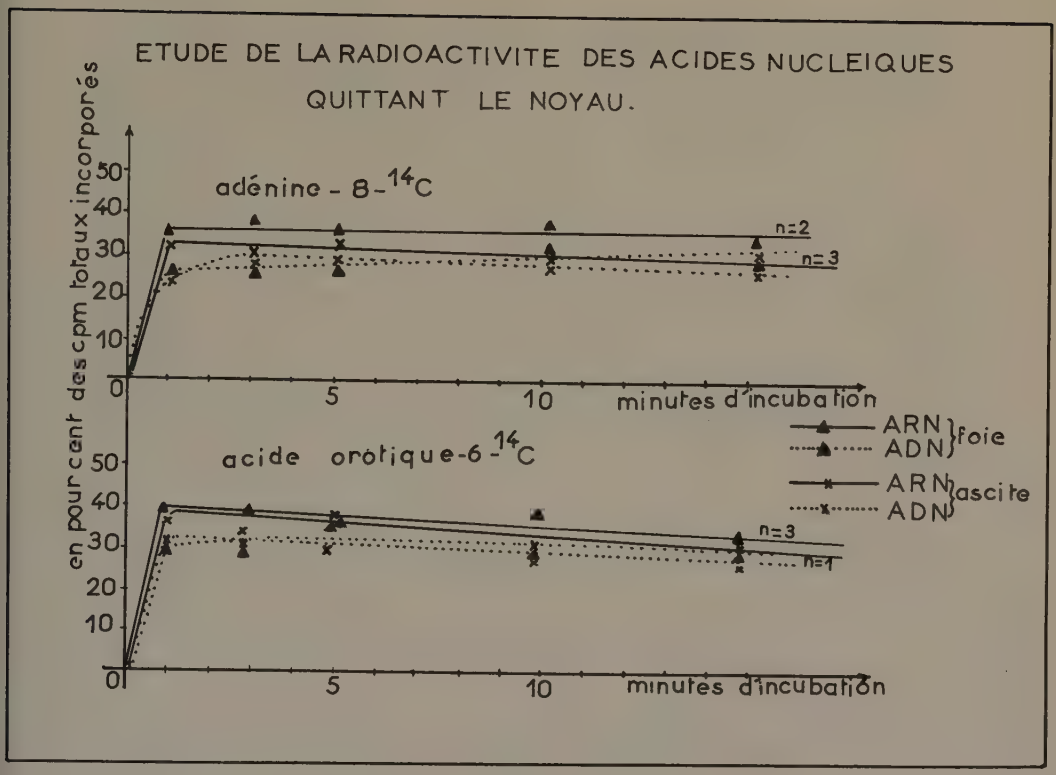


FIGURE 12

de l'ADN du noyau. Nous constatons d'ailleurs qu'il n'y a pas de différence notable dans la migration des deux acides nucléiques entre le foie et l'ascite.

L'AS de l'ADN restant dans le noyau, qui dans ces expériences n'a pas été entièrement débarrassé des contaminations ribonucléiques apparaît cependant très faible comparée à celle de l'ARN qu'il s'agisse du foie ou de la tumeur.

La figure 12 indique la radioactivité incorporée dans les acides nucléiques quittant le noyau au cours de l'incubation par rapport à la totalité. Il en ressort qu'il n'y a pas de différence de comportement entre le noyau hépatique tumoral et le noyau hépatique normal. Nous voyons que l'incorporation de précurseurs radioactifs dans les deux types d'acides nucléiques quittant les noyaux hépatiques normaux et tumoraux au cours de l'incubation est très importante. La part de la radioactivité incorporée dans l'ARN qui quitte le noyau représente pour l'ascite environ 30% à 35% et pour le foie de 35% à 39% environ de la radioactivité de l'ARN nucléaire total au bout de temps d'incubation très courts. Elle se stabilise ensuite. En ce qui concerne la

vitesse de sortie de la radioacitvité incorporée dans l'ADN, elle a une évolution très similaire à celle de l'ARN. Le plateau de la radioactivité de la phase extranucléaire est rapidement atteint. On note à ce moment la présence de 28% à 31% dans le cas de l'ascite et de 26% à 35% dans le cas du foie, de la radioactivité de l'ADN nucléaire total.

Rappelons que nous avons toujours procédé à des incubations de noyaux en présence de polyvinylsulfate (PVS) (25) (10 μ g/ml), inhibiteur de la RNase (110), utilisé par de nombreux auteurs: SCHERRER et DARNELL (329) et HENEY et STORCK (163), etc... Nous avons préféré l'emploi du PVS à celui de la bentonite préconisé par BROWNHILL (45), car elle adsorbe avec la RNAse certaines fractions d'acides nucléiques (170) et (201). De plus, comme la bentonite sédimente en partie avec les noyaux lors de la séparation des noyaux et du milieu d'incubation par centrifugation, l'ARN qu'elle adsorbe se retrouve dans ces conditions dans la fraction nucléaire (voir figure 13). La quantité d'acide

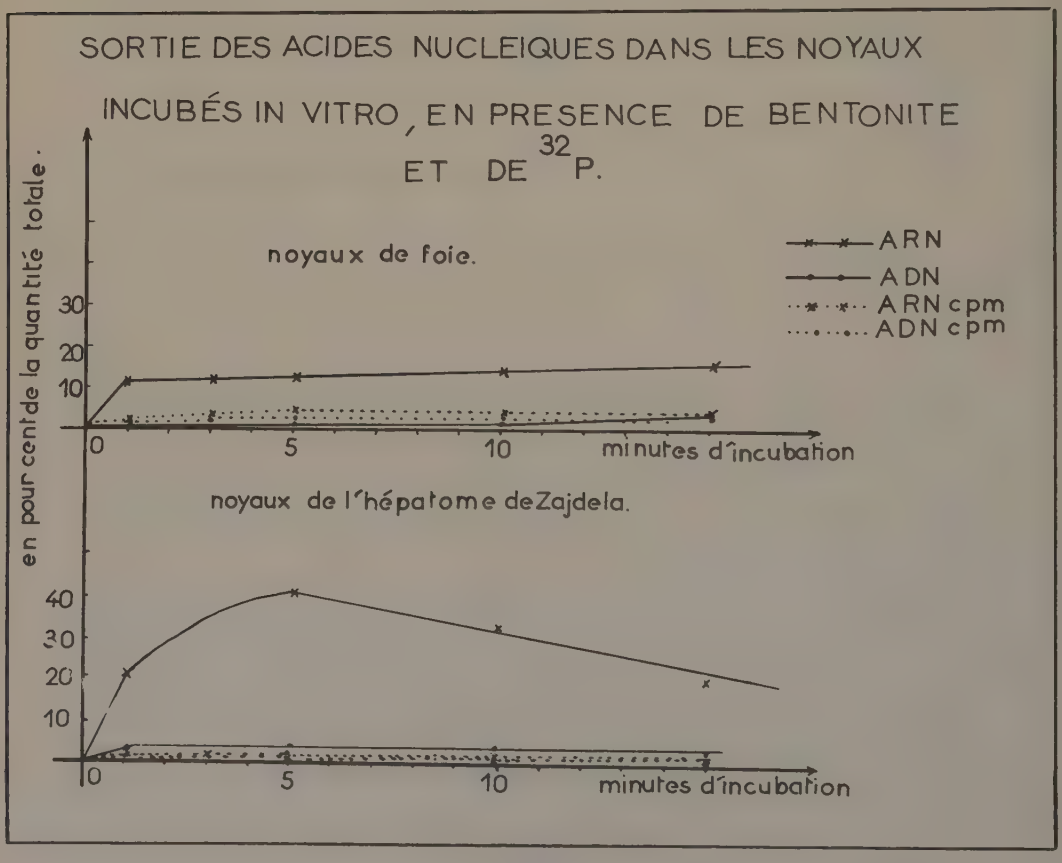


FIGURE 13

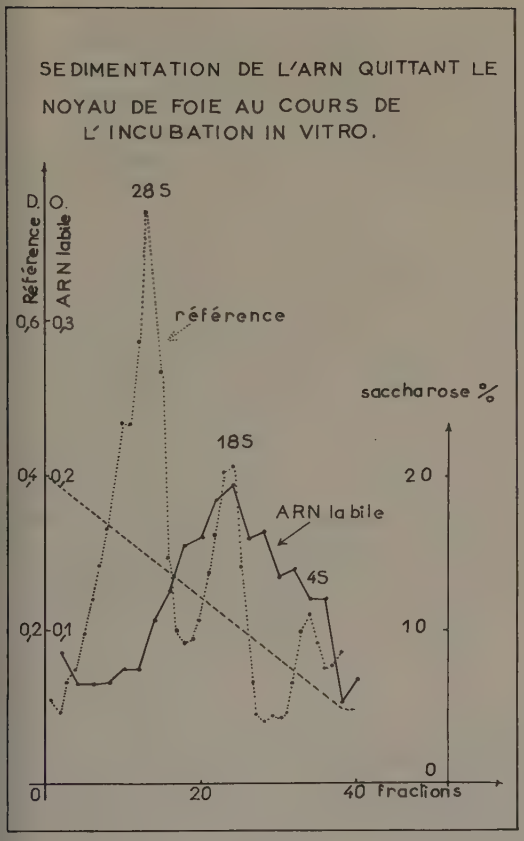


FIGURE 14

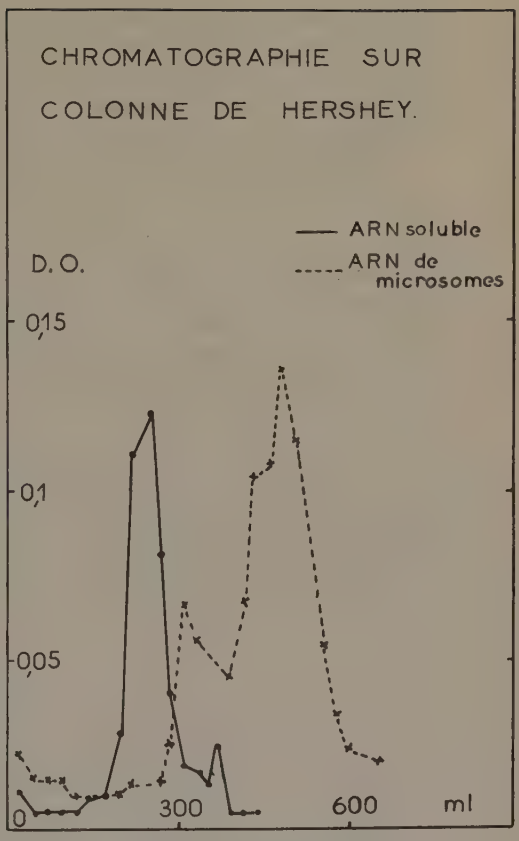


FIGURE 17

nucléique qui migre dans le noyau paraît beaucoup plus faible qu'en réalité. La réduction apparente de la sortie d'acides nucléiques en présence de bentonite est un artéfact.

b) *Etude qualitative.*

Nous avons cherché à préciser la nature de l'ARN qui migrait vers le milieu. S'agit-il de produits de dégradation selon l'opinion de Harris (160) ou d'ARN à poids moléculaire élevé? A cet effet, nous avons incubé *in vitro* des noyaux de foie dans les conditions déjà décrites, pendant 2 ou 5 minutes. Après séparation des noyaux par centrifugation, l'ARN a été extrait par la technique au phénol. Les échantillons ainsi obtenus sont soit ultracentrifugés en gradient de saccharose (5% à 20%) dans le rotor à la Spinco pendant 14 heures, soit séparés

par chromatographie sur colonne d'albumine méthylée. Parallèlement, nous avons effectué une centrifugation et une chromatographie dans les mêmes conditions avec une préparation d'ARN isolé par la même technique à partir des microsomes de foie de rat et de liquide cytoplasmique. Nos résultats sont représentés dans la figure 14. On constate que l'ARN qui sort au cours de l'incubation est constitué en partie par de l'ARN lourd à haut poids moléculaire, comme nous en trouvons dans la préparation d'ARN de microsomes. Notons que la majorité du pic d'absorption aux U.V. correspond à l'ARN qui a sa constante de sédimentation supérieure à 16 S. Il est fortement vraisemblable que malgré l'emploi du PVS inhibiteur de la RNAse une dégradation partielle de l'ARN labile par les nucléases endogènes de noyaux a eu lieu au cours de l'incubation de ces derniers. La chromatographie sur albumine méthylée (figures 15, 16, 17) nous a permis de confirmer

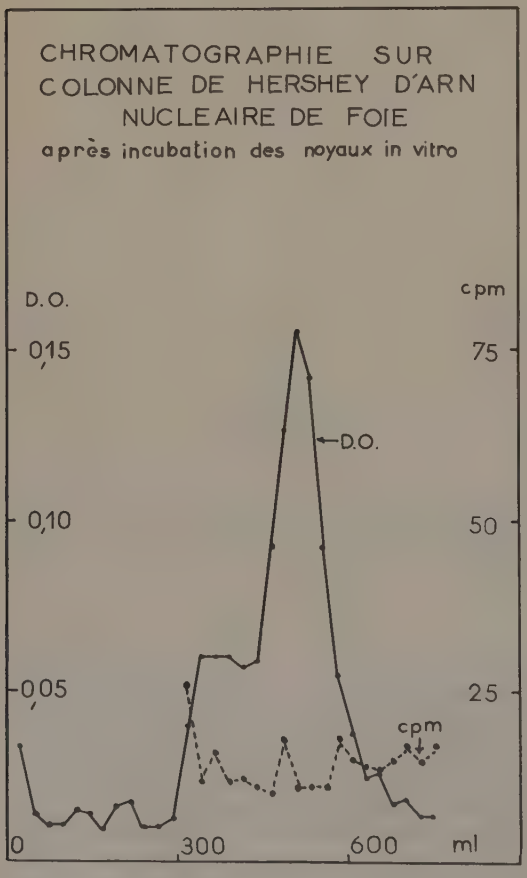


FIGURE 15

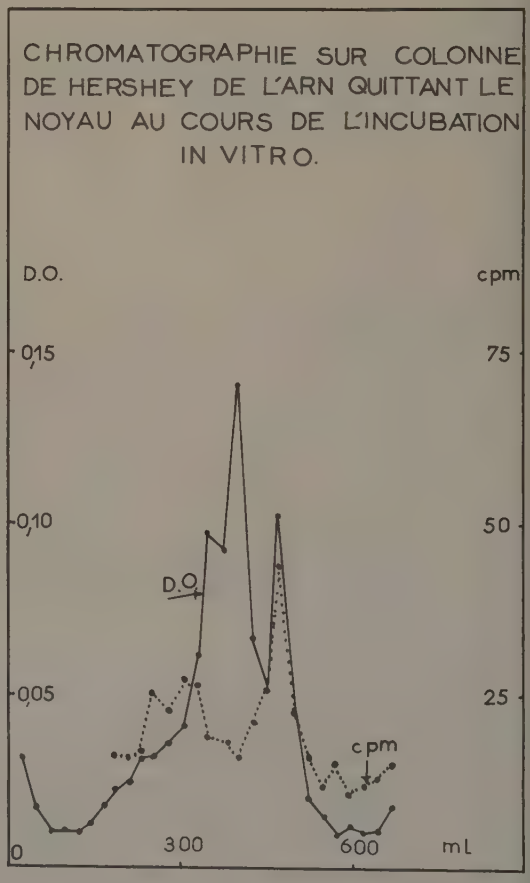


FIGURE 16

que l'ARN rapidement marqué est hétérogène et pour une part même d'un poids moléculaire de l'ordre de 30 S. Ainsi il apparaît que dans des délais extrêmement courts de l'ARN lourd, rapidement marqué, quitte le noyau. La rapidité de marquage et de départ du noyau suggère qu'il pourrait s'agir d'ARN messager. Cependant, la vérification de cette qualité s'avère difficile en raison de l'action des RNAses qui en modifient rapidement les qualités biologiques.

Logan (231) et Allfrey (6) et leurs collaborateurs ont signalé une perte d'ARN, sans en préciser la nature, dans des noyaux de thymus au cours des études *in vitro*. Par ailleurs, les travaux sur le foie de rat de Schneider (340 - 341) d'une part, et de Scholtissek (346 - 348) d'autre part, apportent un appui à notre constatation. Scholtissek (348) a trouvé, lors de l'incubation de noyaux hépatiques dans un milieu voisin du milieu de Logan, l'existence d'un ARN labile *in vitro* qui, *in vivo*, serait transféré dans le cytoplasme et serait l'ARN messager. Schneider (341) dans des expériences d'incubation in vitro de noyaux hépatiques marqués *in vivo*, en présence de liquide cytoplasmique de cellules hépatiques non marquées constate une augmentation de l'activité spécifique de l'ARN cytoplasmique, surtout de la fraction postmicrosomique, en même temps qu'une diminution de l'activité spécifique de l'ARN nucléaire.

Notons cependant que dans toutes ces expériences, avec reconstitution de cellules par addition d'homogénats cytoplasmiques à une fraction nucléaire, les nucléases dont la libération à un taux élevé est inévitable dans les homogénats, favorisent la dégradation de particules dans le milieu d'incubation. Elles créent également les conditions favorables pour l'association de l'ARN labile avec l'ARN particulaire. L'avantage des conditions réalisées dans nos expériences réside dans la présence de taux très faibles de RNAse qui ne peuvent être que d'origine nucléaire et dans l'élimination d'agrégats avec des particules d'origine cytoplasmique plus ou moins dégradées.

Sripati (368) et collaborateurs constatent une libération de particules nucléoprotéiques au cours de l'incubation *in vitro* de noyaux isolés de foie et d'épithélioma. Srinivasan (367) indique que l'ARN migrant du noyau dans le cytoplasme est riche en acide adénylique en acide uridylique, caractère des ARN messagers. Nos résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Revel (319) à la même époque, sur la cellule rénale. Cet auteur a montré qu'une part importante de radioactivité provenant d'un ARN nucléaire labile s'éluait au même niveau que l'ARN ribosomal 30 S en chromatographie sur albumine méthylée. De même, Prescott (309) a conclu à la migration d'un ARN à haut poids moléculaire. A l'opposé, Scholtissek et Potter (347) ont trouvé que le poids moléculaire de l'ARN transféré du noyau dans le cytoplasme était de l'ordre de 10.000 à 15.000. De même, postérieurement

à notre travail, Moriyama et collaborateurs (274) ont conclu à un transfert d'ARN nucléaire marqué dans le cytoplasme non radioactif d'un homogénat reconstitué de cellules d'hépatomes. Selon ces auteurs, l'ARN marqué se trouve dans la zone des ARN légers dans un gradient de concentration en saccharose après ultracentrifugation et s'élue à faible concentration de NaCl en chromatographie sur colonne de Deae cellulose.

Notre constatation n'est pas conforme à l'hypothèse émise par Harris et son école (160) à la suite d'une série de travaux. Pour cet auteur, il n'y a pas de transfert de molécules d'ARN rapidement marqué sans dégradation préalable en composés acido-solubles à l'intérieur du noyau.

De nombreuses expériences d'énucléation de cellules sur du matériel varié: algues (285), amibes (308), cellules Hela (139) ont permis de conclure au passage de matériel ribonucléique du noyau dans le cytoplasme. Goldstein et Plaut (137) qui ont greffé des noyaux d'amibes marqués dans du cytoplasme de ces mêmes organismes unicellulaires non radioactifs ont vu la migration de l'ARN nucléaire au moyen de la technique d'autoradiographie.

L'ensemble des données conduit donc à penser que l'ARN labile correspond sans doute à l'ARN messager, à moins d'une démonstration de synthèse protéique spécifique. Il est évidemment imprudent d'affirmer formellement qu'il s'agit de l'ARN messager. La simple stimulation de synthèse d'ARN ne peut pas suffir à la démonstration du caractère messager, car les polynucléotides de synthèse possèdent également cette propriété. Il en est de même de la distribution de bases, car l'ARN messager qui ne correspond qu'à un fragment d'une chaîne polydésoxynucléotidique ne doit pas avoir forcément les rapports de bases de l'ADN total de la cellule.

3° ETUDE DE LA FRACTION D'ADN LABILE.

Notre attention a été attirée sur l'existence d'une fraction d'ADN quittant le noyau pendant l'incubation et qui se marque très rapidement. Mais l'existence d'une contamination plus ou moins importante de l'ADN n'était pas exclue, vu que les mesures de radioactivité ont été faites sur une fraction obtenue par simple séparation selon Schmidt et Thannnhauser (332) sans purification supplémentaire.

Le problème a été repris avec des méthodes plus rigoureuses pour s'assurer s'il existe effectivement une fraction d'ADN à marquage rapide. Le mode opératoire adopté est résumé dans la figure 18. C'est ainsi que nos déterminations ont été effectuées sur la fraction désoxyribonucléique rendue acidosoluble par la DNAse après élimination

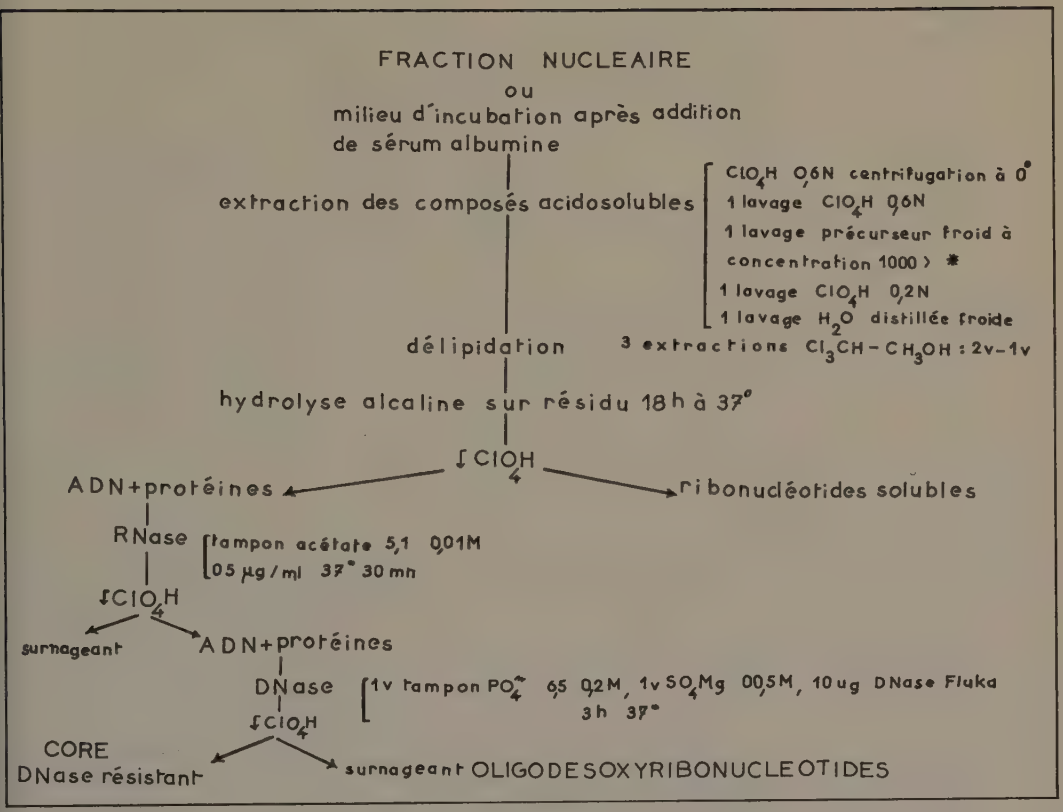


FIGURE 18

préalable soigneuse de l'ARN. La contamination de DNAse par une RNAse ne pouvait pas être une cause d'erreur dans notre cas puisque la préparation, avant d'être soumise à la DNAse, avait déjà été traitée par une forte dose de RNAse.

Le tableau 21 relate nos résultats. Il ressort de l'examen de nos résultats que, déjà après une minute d'incubation, l'ADN qui quitte le noyau possède une activité spécifique extrêmement élevée, comparé à l'ADN chromosomal qui reste dans le noyau. D'autres résultats que nous exposerons plus loin font penser que ce DNA rapidement marqué est d'origine nucléolaire.

TABLEAU 21

ETUDE COMPAREE DE L'AS DE L'ADN QUI QUITTE LE NOYAU ET DE L'ADN QUI RESTE DANS LE NOYAU AU COURS DE L'INCUBATION DE NOYAUX IN VITRO.

Les AS de l'ADN sont exprimés en coups par minute par micromole de nucléotide.

Origine des noyaux	précurseur	temps d'incubation (minutes)	AS de l'ADN	
			quittant le noyau	restant dans le noyau
foie de rat	acide orotique ^{14}C	1	612	91,4
		10	1660	93,4
	Adénine ^{14}C	1	484	67,2
		10	796	63,5
	Thymidine ^{3}H	1	478	92,0
		10	968	91,8
	Thymidine ^{3}H	3	586	169
		10	948	178
hépatome de Zajdela	Adénine ^{14}C	1	1050	590
		10	550	310

C. — *Étude des fractions subnucléaires.*

L'augmentation de la taille du nucléole est commune à toutes les cellules à croissance maligne (235 - 236 - 408) sans en être spécifique (328 - 369 - 371). La comparaison du noyau de foie et du noyau de l'hépatome ascitique de Zajdela révèle également une nette hypertrophie nucléolaire dans le noyau cellulaire tumoral. Ces constatations cytologiques incitent à la recherche de leur expression biochimique. C'est là un fait qui peut avoir un intérêt tout particulier dans la recherche sur le Cancer. Le nucléole, organite bien distinct morphologiquement au sein du matériel chromosomal et très riche en ARN paraît jouer un rôle central dans le métabolisme de l'ARN nucléaire et cytoplasmique. C'est un matériel d'expérimentation qui intrigue de nombreux chercheurs tournés vers les problèmes de corrélation entre la fonction métabolique et la structure cytologique. A côté du nucléole, l'ARN que l'on trouve dans la fraction chromosomique comme celui du suc nucléaire suscite un vif intérêt. Aussi il nous a paru intéressant d'apporter quelques précisions sur la distribution et les corrélations de ces divers types d'ARN nucléaires.

Deux possibilités s'offrent pour le fractionnement des ARN nucléaires: la séparation basée sur les propriétés physicochimiques des divers types d'ARN nucléaires et le fractionnement d'après leur localisation dans les différentes parties ou «compartiments» du noyau. Comme pour l'étude des ARN cytoplasmiques effectuée antérieurement, où nous avons d'abord isolé les différentes fractions subcellulaires et pratiqué ensuite une séparation sur colonne d'amidon cato 2 (252 - 254), nous avons commencé par isoler les différents compartiments subnucléaires par la technique modifiée d'ALLFREY et MIRSKY (5) (voir partie Méthodes). Nous avons procédé ensuite à l'isolement de l'ARN par la technique au phénol pour finir par une étude de ses caractéristiques soit par ultracentrifugation en gradient de saccharose soit par chromatographie sur colonne d'albumine méthylée. Nous avons examiné parallèlement le renouvellement des ARN et de certains ADN des fractions subnucléaires.

1° REPARTITION DES ARN ET DES ADN DANS LES DIVERSES FRACTIONS SUBNUCLEAIRES.

Nous avons analysé dans une première étape la répartition des ARN et des ADN dans les différents compartiments nucléaires isolés comme nous avons déjà indiqué. Une telle répartition fournit l'image de l'équilibre qui s'établit entre les différents types d'ARN nucléaires, conséquence de la cinétique de leur biosynthèse et leur renouvellement respectif.

Nos résultats figurent dans le tableau 22. Les valeurs correspondent à la moyenne de cinq expériences pour le foie et de six expériences pour l'ascite de Zajdela. Il y a une nette différence dans la répartition quantitative des ARN dans les deux types de noyaux. Nous voyons qu'il existe dans le suc nucléaire de la cellule tumorale un taux plus élevé d'ARN, alors que l'ARN du noyau lié aux chromosomes est à un taux plus faible. Par contre les taux d'ARN nucléolaires sont du même ordre de grandeur dans les noyaux de foie normaux et tumoraux.

L'étude de la répartition de l'ADN dans les divers compartiments montre la présence de quantités non négligeables d'ADN dans le suc nucléaire et de très faibles quantités dans le nucléole. La présence d'ADN dans ces compartiments est-elle exclusivement dûe à l'imperfection des méthodes de fractionnement? Nous ne le pensons pas. Nous reviendrons encore sur ce point. Toutefois dans l'idée que l'ADN qu'on retrouve dans le suc nucléaire et éventuellement dans la fraction nucléolaire appartient à l'appareil chromosomal, on peut recalculer les valeurs d'ARN des divers compartiments, en admettant que l'ADN entraîne avec lui des quantités d'ARN dans les proportions dans lequel il se trouve au niveau de l'appareil chromosomal. Nos conclusions demeurent dans ce cas valables, indiquant une richesse plus grande en ARN du suc nucléaire de la cellule tumorale accompagnée d'un contenu plus faible en ARN lié aux chromosomes.

TABLEAU 22

REPARTITION MOYENNE DE L'ARN ET DE L'ADN DANS LES NOYAUX DE FOIE ET D'HEPATOME ASCITIQUE DE ZAJDELA.

Les valeurs correspondent à la moyenne de 5 expériences pour le foie et 6 expériences pour l'ascite
Les nombres expriment les valeurs moyennes de molécules d'ARN pour 100 molécules d'ARN total.

Acide nucléique	Origine nucléaire	suc nucléaire	fraction chromosomale	fraction nucléolaire I	fraction nucléolaire II
ARN	Foie Ascite test t	30,5 ± 2,7 51,3 ± 7,3 p< 0,01	32,1 ± 3,2 19,3 ± 6,5 p< 0,01	32,2 ± 1,6 27,5 ± 6,9 p> 0,1	5,2 ± 3,0 1,9 ± 0,4 p< 0,05
ADN	Foie Ascite test t	28,5 ± 6,9 13,4 ± 4,0 p< 0,01	68,2 ± 6,6 79,1 ± 3,6 p< 0,05	2,7 ± 0,7 5,4 ± 3,3 p> 0,05	0,6 ± 0,6 2,0 ± 2,1 p> 0,1

TABLEAU 23

COMPOSITION EN BASES DE L'ARN EXTRACTIBLE PAR LA METHODE AU PHENOL DE FRACTIONS SUBNUCLEAIRES DE FOIE ET D'HEPATOME DE ZAJDELA

Fraction nucléaire		CMP	GMP	AMP	UMP	$\frac{C + G}{A + U}$
Ribosomes nucléaires	F	30,6 ± 1,4	31,4 ± 1,1	17,1 ± 0,8	20,9 ± 1,1	1,62±0,3
	A	29,9 ± 1,5	35,9 ± 2,0	17,1 ± 0,9	17,1 ± 0,9	1,92±0,13
Surnageant nucléaire	F	25,2 ± 1,7	30,7 ± 0,6	16,7 ± 0,4	27,4 ± 1,5	1,26±0,05 (o)
	A	28,3 ± 0,2	34,0 ± 0,9	18,0 ± 0,4	19,7 ± 1,5	1,66±0,05 (o)
Nucléoles	F	30,4 ± 2,4	35,2 ± 3,2	15,1 ± 1,9	19,3 ± 1,1	1,91±0,12 (o)
	A	27,4 ± 1,1	33,9 ± 1,8	16,5 ± 1,8	22,2 ± 1,6	1,58±0,08 (o)

F = noyaux de foie de rat
A = noyaux de l'ascite de zajdela
o = différence significative (p 0,05)

Il ressort que les rapports $\frac{C + G}{A + U}$ du foie normal comparé à ceux de la tumeur sont significativement différents dans le surnageant nucléaire et les nucléoles. Le rapport plus élevé dans le surnageant nucléaire s'ajoute à la différence quantitative déjà constatée dans ce compartiment nucléaire de la cellule tumorale. Le rapport C + G/A + U plus faible dans les nucléoles de l'hépatome est un indice de différence qualitative alors qu'il n'y a pas de différence quantitative entre les nucléoles normaux et tumoraux.

Etant donné la différence quantitative de suc nucléaire entre les deux types de cellules, nous avons procédé à une séparation supplémentaire de cette même fraction. Par ultracentrifugation à la Spinco pendant 2 heures à 105 000 g nous obtenons un «surnageant» qui constitue le liquide nucléaire et un culot particulaire correspondant aux «microsomes» et les «ultramicrosomes» du suc nucléaire décrit par Georgiev et Samarina (128) dans le foie de rat. Il s'avère que 70% à 75% de l'ARN du suc nucléaire se trouve sous forme d'ARN ribosomique ou particulaire le reste étant de l'ARN non particulaire dit ARN soluble, autant dans le noyau de la cellule hépatique normale que tumorale. On est donc conduit à penser que ce sont les ARN particulaires et l'ARN soluble du noyau qui existent à un taux plus élevé dans la cellule tumorale. La tableau 23 indique la distribution des bases de l'ARN dans ces deux compartiments subnucléaires.

D'après les données quantitatives que nous venons d'apporter il ressort que dans le noyau de la cellule cancéreuse nous assistons à un enrichissement en ARN ribosomal et en ARN soluble du suc nucléaire par rapport à la quantité présente dans le noyau des cellules homologues à métabolisme normal. Ceci est conforme aux idées d'un transfert de matériel ribonucléique du noyau vers le cytoplasme (voir étude de l'ARN labile du noyau incubé *in vitro*) et du métabolisme très actif de l'ARN de la cellule cancéreuse. L'ARN du suc nucléaire formerait une voie de passage des ARN ou des précurseurs de l'ARN cytoplasmiques, fabriqués dans les autres compartiments nucléaires, les chromosomes et le nucléole. Dans la même optique, signalons le travail de Frenster (119) sur le métabolisme et la morphologie de particules ribonucléoprotéiques du noyau de lymphocytes, de Pogo (303) sur les cellules de thymus, et de Winkelmanns (402) sur des ribosomes de cellules Hela qui ont mis en évidence la ressemblance frappante entre les ribosomes nucléaires et cytoplasmiques. Notons que Harris (160) met en doute l'existence du compartiment ribosomal et du surnageant dans le suc nucléaire. Pour cet auteur l'existence d'un ARN soluble du suc nucléaire serait essentiellement dû à une contamination cytologique et les dimensions et caractéristiques de particules ribonucléoprotéiques de ce compartiment seraient dûes au mode préparatoire des fractions subnucléaires. Par contre Sporn et Dingmann (366) sont frappés par l'importante quantité, bien supérieure à ce que nous trouvons pour le noyau de foie, d'ARN soluble nucléaire. Remarquons que dans nos études de l'ARN nucléaire total sur colonne d'albumine méthylée, nous n'avons pas obtenu de pic net d'ARN soluble. Les derniers auteurs cités suggèrent que cet ARN soluble nucléaire aurait un rôle soit dans la répression de la biosynthèse de l'ARN messager, soit dans celle de l'ARN ribosomal. Chipchase et Birnstiel (79) ont montré que la synthèse d'ARN soluble était DNAdépendante. Nous pensons comme Gudbjarnson et de Schryver (155) que les ribosomes nucléaires sont à l'origine des microsomes cytoplasmiques. Ces auteurs opérant sur du muscle cardiaque de chiens

normaux et de chiens présentant un infarctus expérimental, ont constaté que les ribosomes nucléaires étaient marqués plus tôt que ceux du cytoplasme au cours du processus de réparation tissulaire. Nous voyons dans la présence d'une proportion importante d'ARN dans le compartiment du suc nucléaire de la cellule tumorale, la confirmation du métabolisme exalté des acides nucléiques, caractéristique de la cellule cancéreuse.

Par ailleurs, nous avons aussi constaté que dans la cellule tumorale il y a moins d'ARN «lié aux chromosomes» et, fait étonnant, une proportion équivalente d'ARN nucléolaire. A priori on s'attendait plutôt à trouver une proportion plus élevée d'ARN dans le compartiment, étant donné l'hypertrophie du système nucléolaire dans le noyau tumoral et l'idée admise par beaucoup d'auteurs dont LETTRÉ (228), que le nucléole fait fonction d'accumulateur ou de dépôt de matériel synthétisé au niveau des chromosomes et ~~qui sont~~ déchargés suivant les besoins de la cellule vers le cytoplasme. Mais de nombreux faits sont là, en particulier les études d'incorporation de radio-isotopes, pour ne pas nous faire admettre totalement cette conception.

Nous pensons que le fait d'avoir moins d'ARN lié aux chromosomes peut s'expliquer par le caractère de perturbation métabolique de la cellule cancéreuse dûe en partie à une dédifférentiation plus ou moins prononcée. Or, à la dédifférentiation cellulaire est liée une simplification de métabolisme d'où un besoin moins grand en variétés de protéines qui a pour cause ou qui se traduit par une synthèse d'un nombre d'ARN type messager plus réduit. Les gènes de structure de l'ADN chromosomal de la tumeur serviraient plutôt à la duplication fréquente, qui aurait pour effet une division cellulaire intense, qu'à la traduction spécialisée, par les ARN messagers en vue de synthèse protéique pour le fonctionnement hautement différencié de la cellule. Ou bien existe-t-il au niveau de chromosomes de noyau cancéreux l'action de gènes de régulation qui seraient à l'origine de phénomènes de répression comme dans le cas des bactéries (187)?

2° BIOSYNTHESE ET RENOUVELLEMENT DES ARN DES DIFFERENTS COMPARTIMENTS NUCLEAIRES.

La figure 19 donne le profil de sédimentation en gradients de saccharose d'une même préparation d'ARN cytoplasmique de foie de rat dans nos conditions de centrifugation. Il ressort nettement que dans nos conditions expérimentales, les sédimentations effectuées en gradient de 5 à 20% de saccharose (avec le rotor SW 25) permettent une meilleure séparation des ARN lourds. Toutefois nous rapporterons des résultats obtenus avec le rotor SW 39 (figures 20 à 28), ceux-ci ayant été obtenus à une époque où nous ne pouvions pas disposer de rotor SW 25. Cette figure 19 sert comme élément de référence pour tous les résultats d'ultracentrifugation que nous allons exposer.

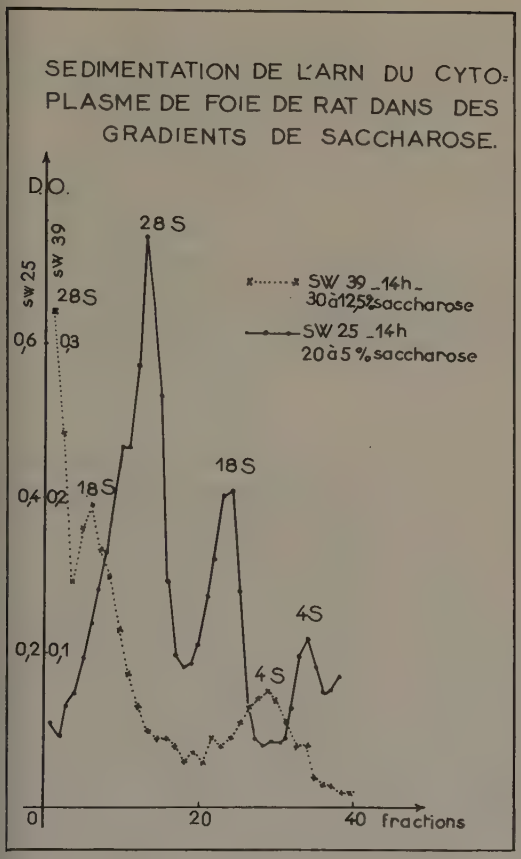


FIGURE 19

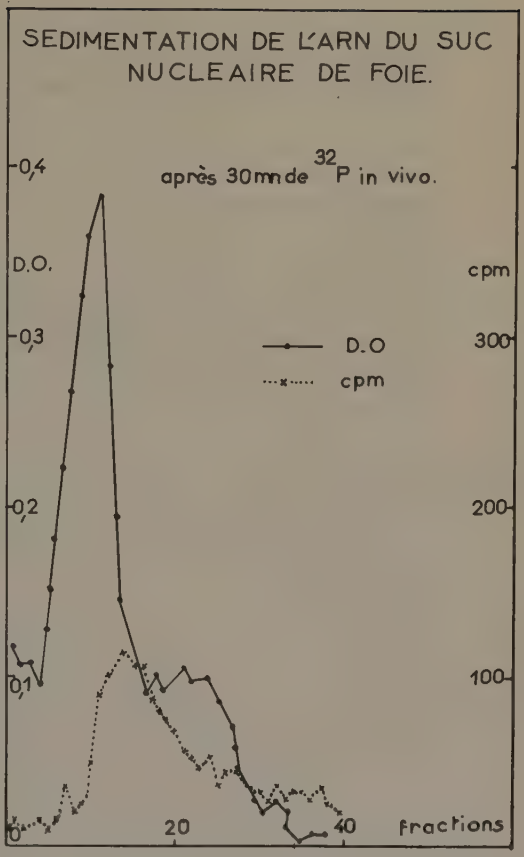


FIGURE 20

Après un marquage de 30 minutes *in vivo*, les ARN des diverses fractions nucléaires extraits par la technique au phénol (voir partie Méthodes) ont été soumis à une ultracentrifugation dans un rotor SW 39 pendant 14 heures en gradient de saccharose de 12,5% à 30%. Les figures 20, 21, 22 indiquent la sédimentation d'un suc nucléaire, d'une fraction chromosomale et nucléolaire de foie de rat. Nous constatons que le suc nucléaire renferme essentiellement de l'ARN qui correspond à l'ARN ribosomique nucléaire, à côté d'un ARN plus léger de type soluble, dont le taux est faible. La fraction nucléolaire et chromosomale semblent être constituées par de l'ARN moyennement lourd, de taille moléculaire assez voisine. Rappelons que les études cytologiques et d'ultrastructure du nucléole de Love et Baradjan (234) ont mis en évidence au sein de la «pars amorpha» du nucléolonéma (26 - 27) des ribonucléoprotéines, particules qui correspondent aux «nucléolini» des histologistes classiques.

La comparaison des courbes de radioactivité correspondant à ces trois types d'ARN nucléaire révèle des différences très notables: l'ARN chromosomal paraît peu marqué, même si l'on tient compte du fait que 80% à 90% de la densité optique du complexe ARN—ADN appartient à l'ADN, le marquage de l'ARN apparaît relativement plus faible au délai de 30 minutes comparé à celui du nucléole. Il faut penser que l'activité spécifique maximum se situe à des délais plus courts mais à cause des incertitudes de la vitesse de diffusion du précurseur et de sa dilution, il est difficile d'étudier en pratique des délais plus courts *in vivo*. L'incorporation de $^{32}PO_4'''$ est plus importante dans le suc nucléaire et atteint le maximum dans le compartiment nucléolaire. Il semble que l'ARN nouvellement synthétisé se situe ou est stocké passagèrement dans le nucléole.

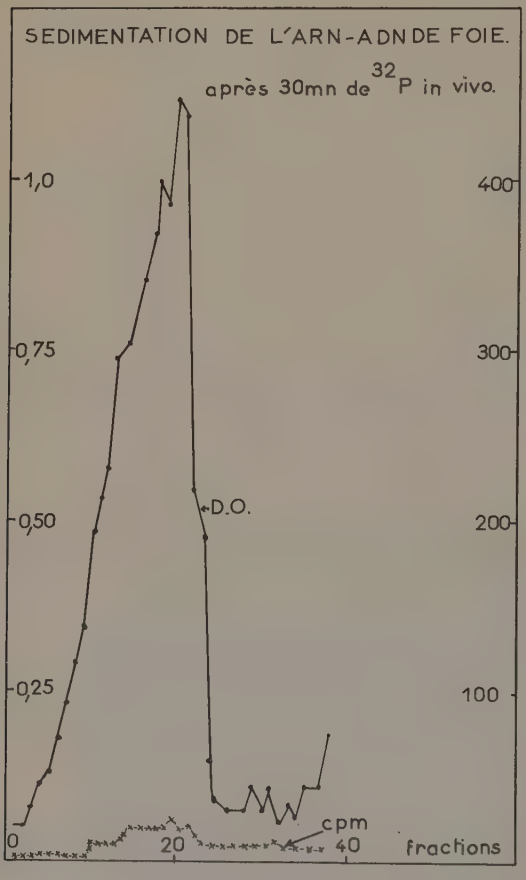


FIGURE 21

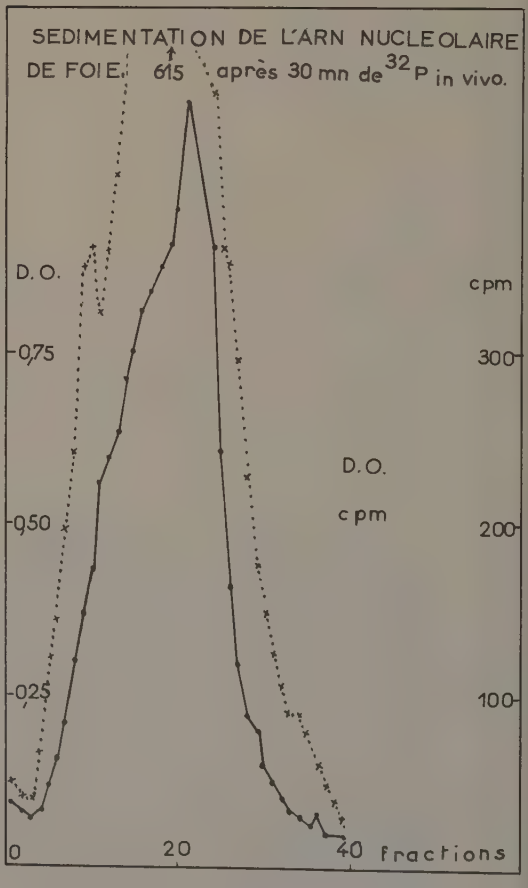


FIGURE 22

Le suc nucléaire présentant une radioactivité plus faible à des délais de marquage courts serait une voie de passage de l'ARN du nucléole et qui migrerait vers le cytoplasme. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'effet d'une dilution massive du pool de précurseur (radioactif), d'une chasse avec du PO_4''' froid sur l'incorporation de $^{32}PO_4'''$ dans le suc nucléaire. Ainsi 30 minutes après l'injection de $^{32}PO_4'''$ à raison de 300 µc par 100 g de poids corporel, nous avons administré deux fois, à un intervalle de 30 minutes, 10 mg de PO_4''' par voie intrapéritonéale, avant le sacrifice qui a lieu deux heures après l'injection de $^{32}PO_4'''$. Le résultat d'un tel essai se trouve résumé dans la figure 23. Il ressort de la comparaison des figures 20 et 23 que la radioactivité est plus élevée au délai de deux heures dans le suc nucléaire qu'il n'a été à 30 minutes. Comme le marquage du pool de précurseur avait été réduit par l'expérience de chasse, la radioactivité du suc nucléaire ne peut provenir que du nucléole, qui est déjà fortement marqué au délai de 30 minutes. Il s'avère également que les ARN de l'ordre de 20 S et plus légers sont plus marqués que les ARN les plus lourds. Remarquons qu'en séparant la fraction particulaire et soluble du suc nucléaire (voir tableau 24) on note que c'est cette dernière qui est la plus active dans le foie in vivo comme dans l'hépatome de Zajdela *in vivo* et *in vitro*. Une observation semblable a été faite par Georgiev et Samarina (128) sur les cellules ascitiques d'Ehrlich. Le phénomène paraît être général. L'interprétation de ce phénomène reste cependant difficile à fournir dans l'optique que c'est l'ARN messager qui possède le renouvellement le plus actif. Il convient d'admettre que l'activité de l'ARN soluble doit être mise sur le compte de l'ARN messager qui provient du nucléole où il avait été stocké après avoir été synthétisé au niveau de l'ADN.

Dans une autre série d'expériences, nous avons recherché l'évolution de l'incorporation de $^{32}PO_4'''$ dans l'ARN nucléolaire en fonction du temps de marquage. Les figures 22, 24, 25 correspondent à des ARN nucléolaires de foie après divers délais de marquage *in vivo*: 30 mn, 3 h, 15 h. L'examen des ces diagrammes révèle que la fraction d'ARN nucléolaire est fortement marquée. L'ARN nucléolaire qui incorpore intensément à des délais courts, 30 minutes, reste très longtemps marqué (3 heures) et le marquage de l'ARN néosynthétisé ne diminue que lentement (15 heures). Le fait qu'après une expérience de chasse, 30 minutes après injection de précurseur radioactif, on trouve au bout de 2 heures et demi encore un ARN fortement marqué dans le nucléole, est un argument solide en faveur d'un rôle de stockage joué par le nucléole (figure 26). De plus, il apparaît que l'ARN nouvellement marqué présente une grande stabilité. Il se distingue ainsi très nettement de l'ARN labile des cellules bactériennes.

La radioactivité de l'ARN du compartiment chromosomal (voir figures 21, 27, 28 et aussi figure 29) s'accroît lentement aux délais postérieurs à 30 minutes. On est ainsi amené à concevoir deux types

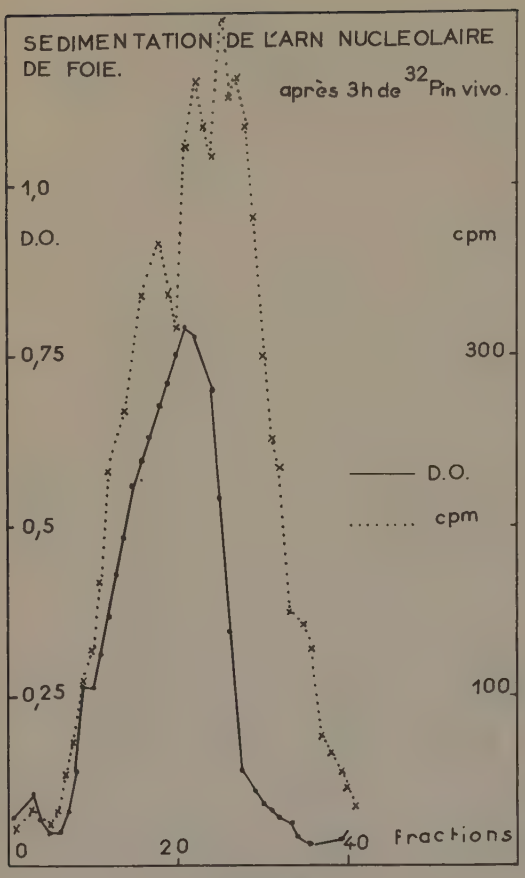


FIGURE 24

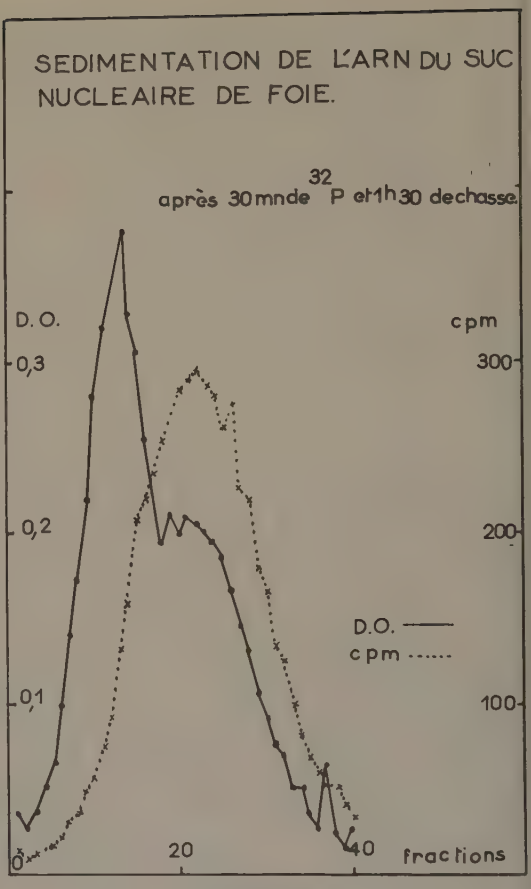


FIGURE 25

TABLEAU 24

COMPARAISON DE L'AS ARN RIBOSOMAL ET L'AS ARN SOLUBLE DU NOYAU DE FOIE ET DE L'HEPATOME ASCITIQUE DE ZAJDELA.

(Les AS ARN sont exprimées en cpm/µgP ARN.)

Exp.	Origine nucléaire	durée de marquage	AS ARN soluble	AS ARN ribosomal
1	foie	2h30 in vivo	588	299
2	foie	2h30 in vivo	615	342
3	ascite	30mn in vitro	845	110
4	ascite	30mn in vivo	895	147

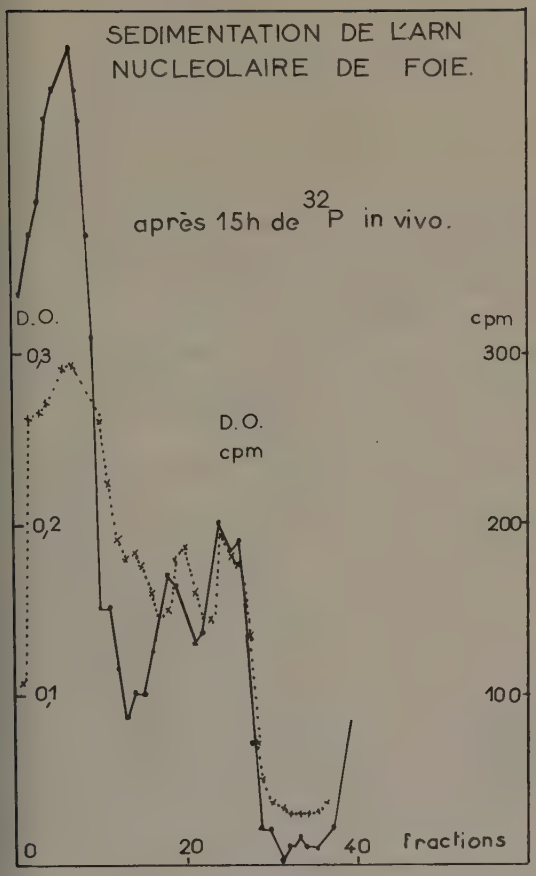


FIGURE 25

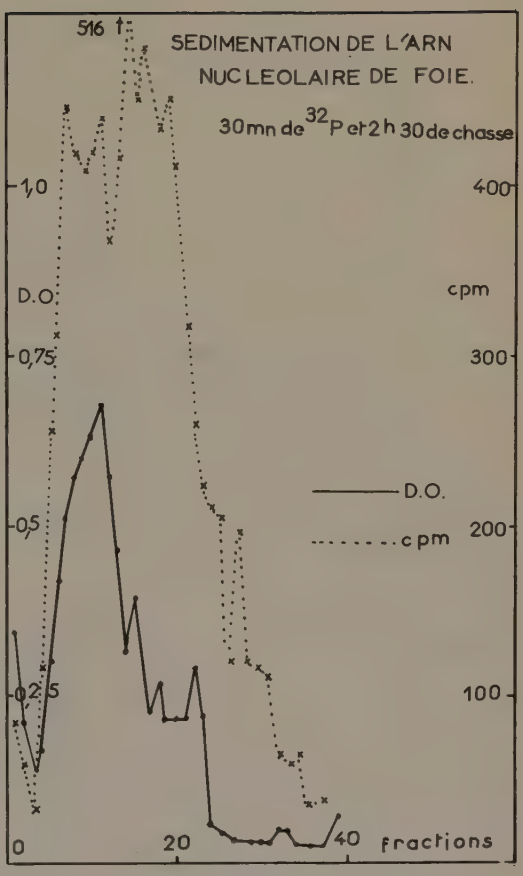


FIGURE 26

deux synthèses dans le comportement chromosomal, l'une extrêmement précoce et rapide, qui fournit l'ARN stocké par la suite dans le nucléole et l'autre synthèse se réalisant lentement. Nous nous proposons d'étudier ultérieurement ce type d'ARN.

Il est à peine nécessaire de rappeler que les changements de profil du diagramme d'absorption dans l'UV des ARN est à mettre sur le compte de dégradations quasiment inévitables au cours des préparations et des centrifugations de longue durée.

Ayant constaté qu'il n'était pas possible de séparer l'ARN du complexe chromosomal de l'ADN au stade de l'extraction, nous avons cherché à l'individualiser au cours des essais de sédimentation dans un gradient de saccharose (5% à 20% dans le rotor SW 25 pendant 14 heures). Or, autant pour le foie que pour l'hépatome, on obtient un pic dominant qui contient à la fois de l'ARN et essentiellement de

l'ADN (80 à 90%). Le simple chauffage (15 minutes à 100°) suivi de refroidissement rapide ou lent selon SCHIDKRAUT et collaborateurs (330) ne permet pas de séparer les deux types d'acide nucléique (figure 30). Nous reviendrons encore sur ces expériences de dénaturation et de renaturation. Pour expliquer ce fait, il y a deux possibilités: l'une est que la technique de séparation en gradient de saccharose n'est pas assez sensible pour dépister la séparation éventuelle des deux types d'acides nucléiques, l'autre est que nous avons sans doute déjà des dénaturations au cours des manipulations avant le chauffage. Pour répondre à ces questions, des recherches utilisant d'autres techniques de préparations et d'autres façons d'identification sont en cours.

Dans tous les diagrammes du complexe ARN-ADN obtenu à partir de la tumeur d'ascite, le pic de la radioactivité est décalé par rapport à celle de la densité optique. Fait curieux, ce décalage n'est

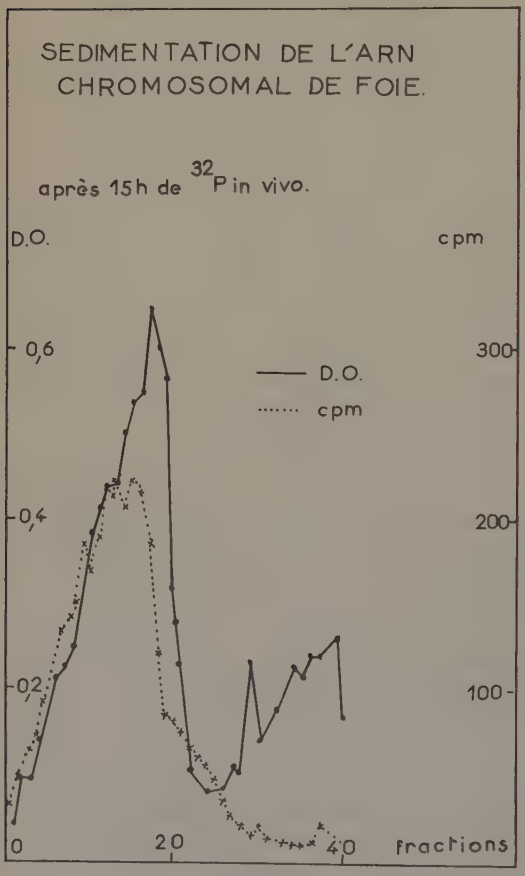


FIGURE 27

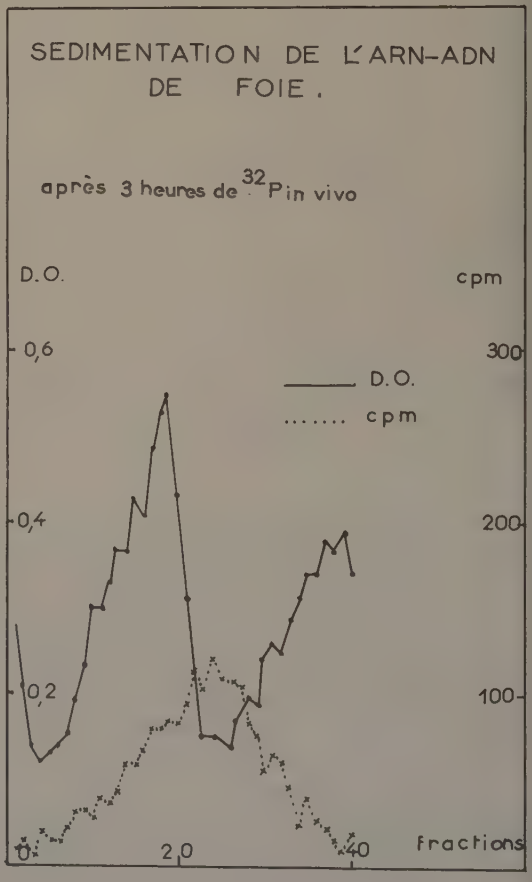


FIGURE 28

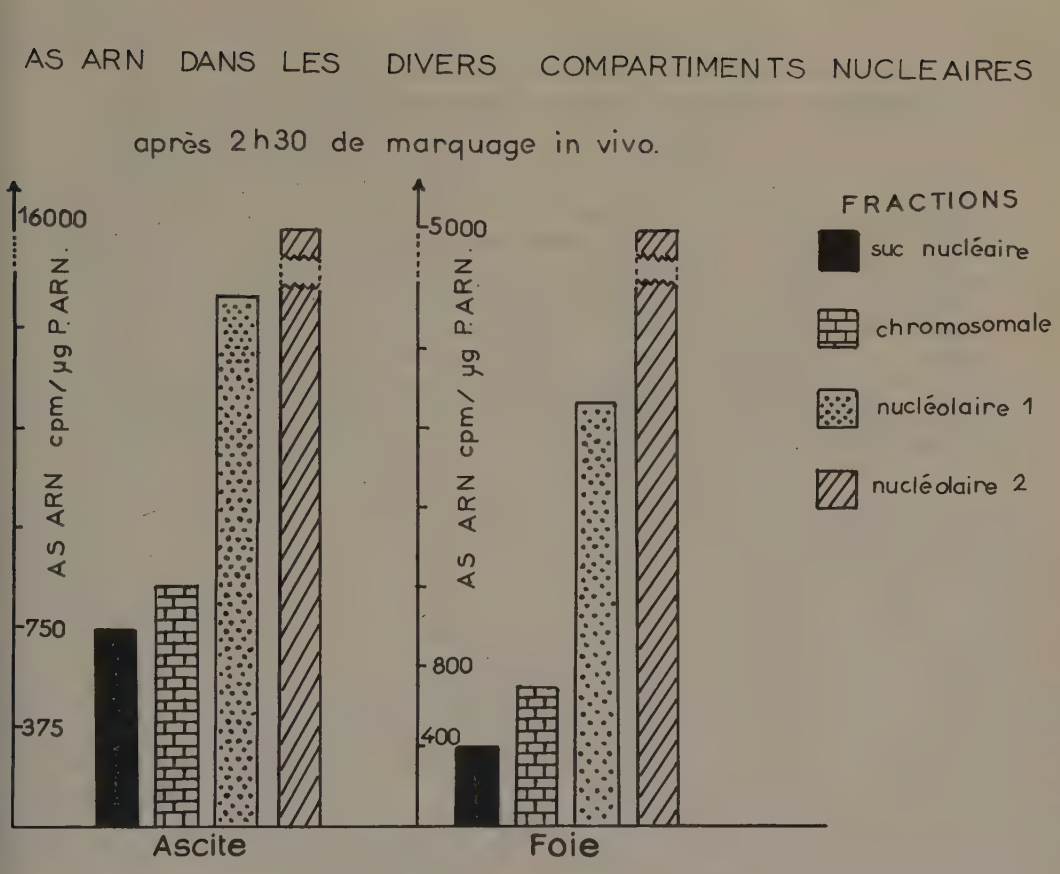


FIGURE 29

pas à mettre seulement sur le compte de la situation de l'ARN puisqu'on l'obtient également en utilisant comme précurseur la thymidine tritiée (voir figure 31). Comme il s'agit de cellules tumorales incubées *in vitro* avec des marqueurs de l'ARN et de l'ADN, il convient d'admettre l'existence d'une certaine hétérogénéité de marquage de l'ADN. Pour faire la part de la radioactivité de l'ARN dans le complexe ARN—ADN, nous avons soumis les différentes fractions obtenues après ultracentrifugation dans un gradient de saccharose à l'action de la RNAse. Il s'est alors avéré qu'au délai de marquage appliqué, approximativement 80% de la radioactivité se retrouvait dans les mono- et oligonucléotides acidosolubles obtenus après action de la RNAse légèrement contaminée par une DNAse (figure 32). Ce même type d'expérience nous a révélé l'hétérogénéité de l'ARN du complexe ARN—ADN.

Nous avons effectué des essais d'incubation de cellules d'ascite *in vitro* dans leur propre liquide ascitique additionné de traces d'héparine, de glucose à raison de 1 g par litre, de pyruvate à 96 mg par litre, de succinate à 8,4 mg par litre, en absence et en présence d'actinomycine D (1 µg/ml), antibiotique chromopeptidique, qui complexe l'ADN (156 - 202). L'incubation a été faite à 37° pendant 30 minutes sous oxygénation et agitation constante. Après ce délai, il a été ajouté aux deux lots, 10 µc de $^{32}PO_4$''' par ml et l'incubation a été poursuivie pendant 30 minutes. On a procédé ensuite au fractionnement subnucléaire après avoir éliminé le milieu d'incubation par centrifugation. Les figures 33 et 34 font état de nos résultats. Elles révèlent que l'actinomycine D provoque, à faible dose, une réduction considérable d'incorporation de radioactifs et indiquent qu'il s'agit d'un ARN type messager. Signalons que nous avons aussi enregistré une inhibition

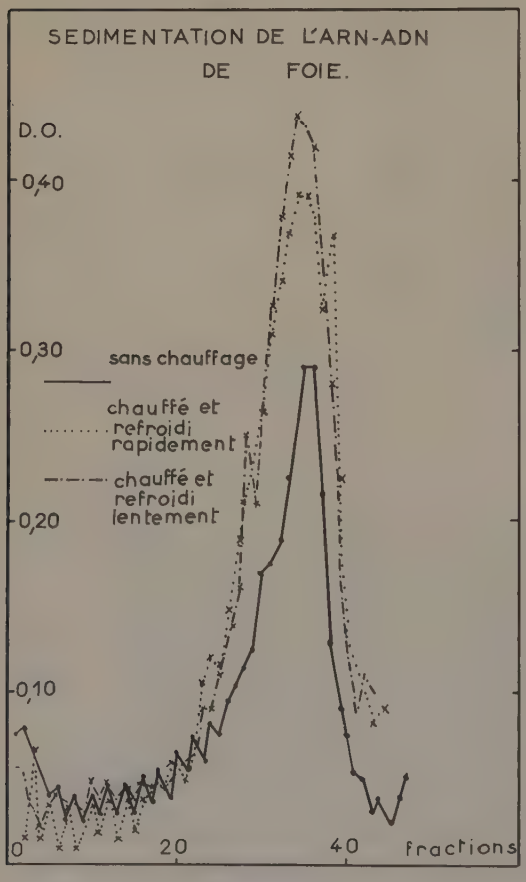


FIGURE 30

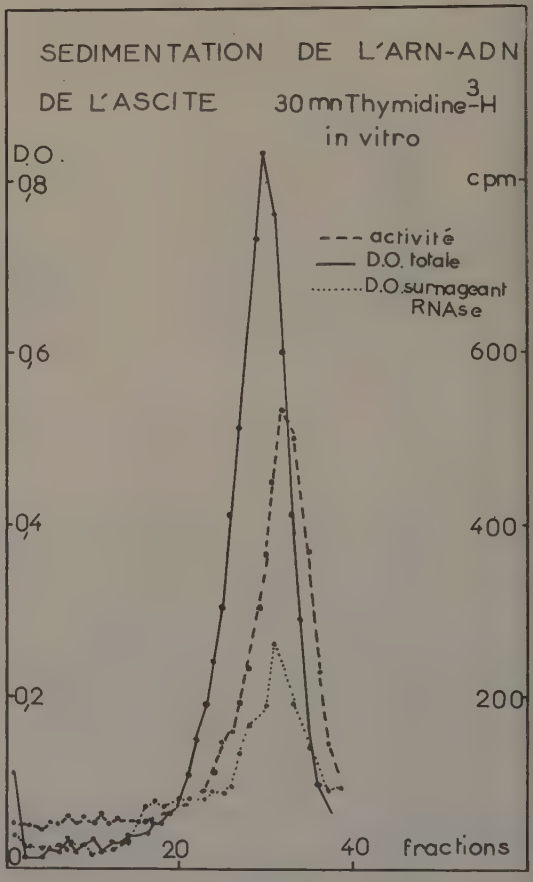


FIGURE 31

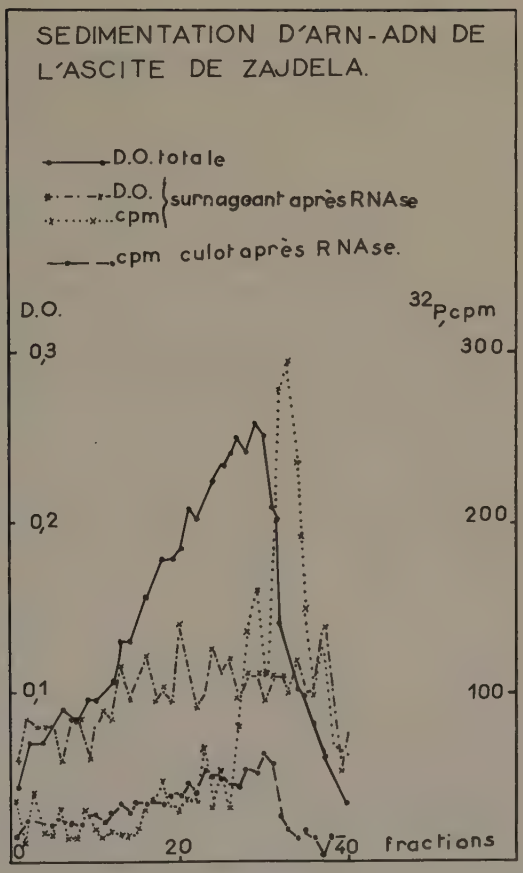


FIGURE 32

de la néosynthèse de l'ARN au niveau du compartiment nucléolaire sous l'effet de mêmes doses d'actinomycine D. Ces faits semblent bien parler en faveur d'une dépendance des synthèses d'ARN dans les deux compartiments nucléaires.

Notre étude comparative entre le foie normal et l'hépatome de Zajdela a également porté sur la fraction d'ARN nucléolaire, qui a été fractionné par chromatographie sur colonne d'albumine méthylée. Nous avons souvent dû procéder à un enrichissement de nos préparations d'ARN nucléolaires, soit par de l'ARN soluble, soit par de l'ARN de microsomes. Dans ce cas, une chromatographie parallèle a été effectuée avec l'ARN entraîneur en vue de la détermination des U.V. correspondants à la préparation d'ARN nucléolaire. Le chromatogramme de la figure 17 indique l'élution dans l'ARN soluble et d'un ARN de microsomes dans nos conditions expérimentales. Les figures

35, 36, 37, 38 correspondent aux résultats obtenus pour les deux types d'ARN nucléolaire. Pour réduire la cause d'erreur dans les soustractions de densités optiques nous avons préféré rapporter des moyennes. Chaque point sur ces graphiques correspond à la moyenne de quatre fractions consécutives. Pour nous assurer que la différence enregistrée était indépendante du mode d'extraction, celui-ci a été effectué soit par le phénol chauffé à 65°, soit par le phénol en présence d'urée, comme nous l'avons indiqué dans la partie Méthodes. Notons tout d'abord que l'extraction à 65° nous a fourni dans les deux cas de l'ARN plus radioactif. Les diagrammes d'absorption aux U.V. ont été établis après déduction de l'absorption de l'ARN froid qui a servi d'entraîneur à l'ARN nucléolaire radioactif. Les courbes qui tiennent compte de la distribution de la radioactivité correspondent à AS ARN exprimé en cpm/µg P-ARN pour chaque fraction. Nous constatons

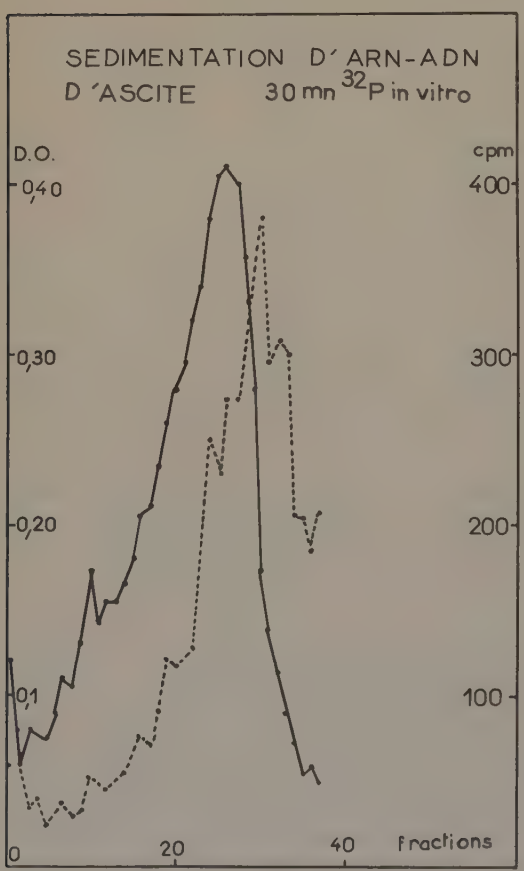


FIGURE 33

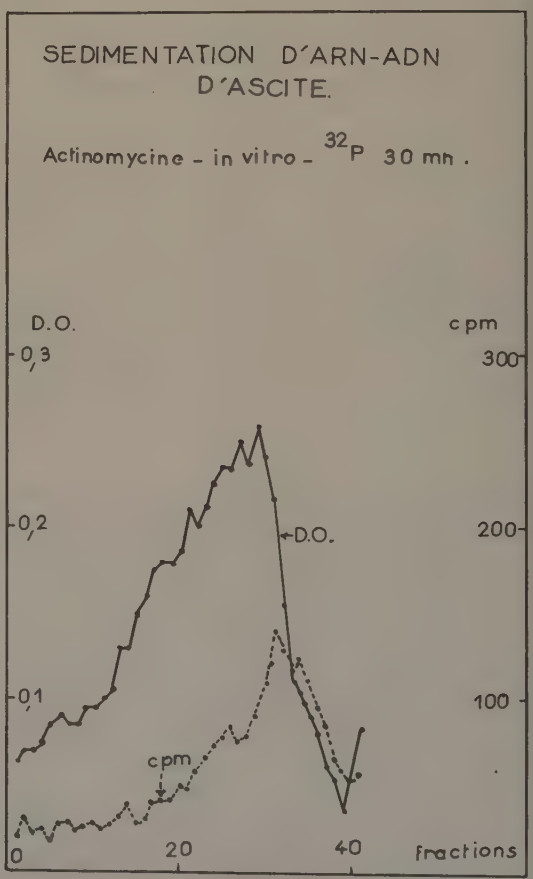


FIGURE 34

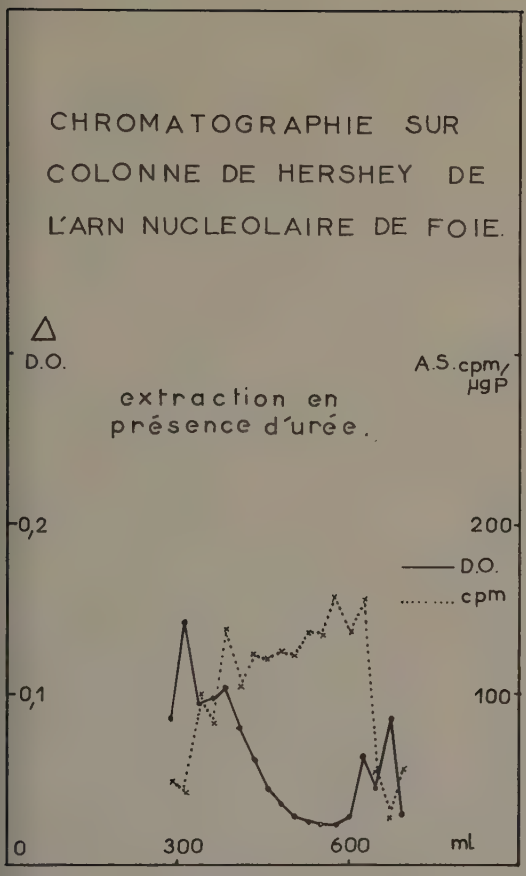


FIGURE 35

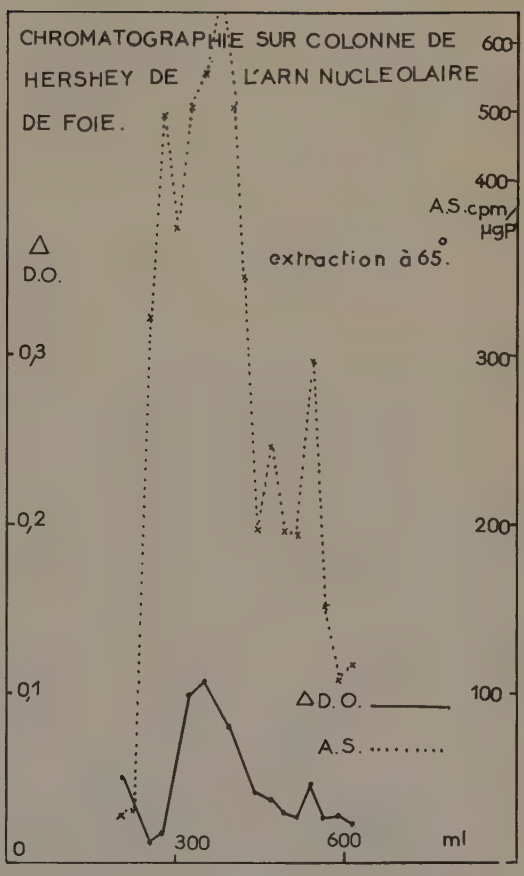


FIGURE 36

TABLEAU 25

EFFET DE LA PURIFICATION SUR COLONNE DE CHARBON, SUR L'AS ARN DU NOYAU ET DES DIFFERENTES FRACTIONS SUBNUCLEAIRES MARQUEES AU $^{32}PO_4^{'''}$

(Les AS sont exprimées en cpm/µg P).

Origine nucléaire	fraction	noyau total	suc nucléaire	ARN-ADN	nucléole fraction I	nucléole fraction II
Foie	Total	2570	416	576	3540	64200
	Effluent	4700	1300	560	4040	76200
	Eluat	196	130	246	980	12700
Ascite de Zajdela	Total	96500	13100	24700	4800	1680000
	Effluent	195000	45200	33000	9900	2090000
	Eluat	4350	1080	1680	4150	31500

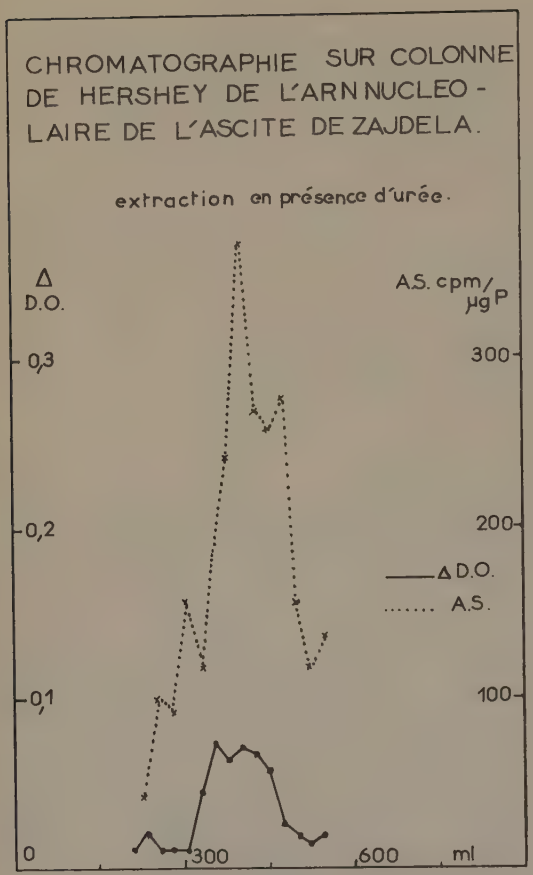


FIGURE 37

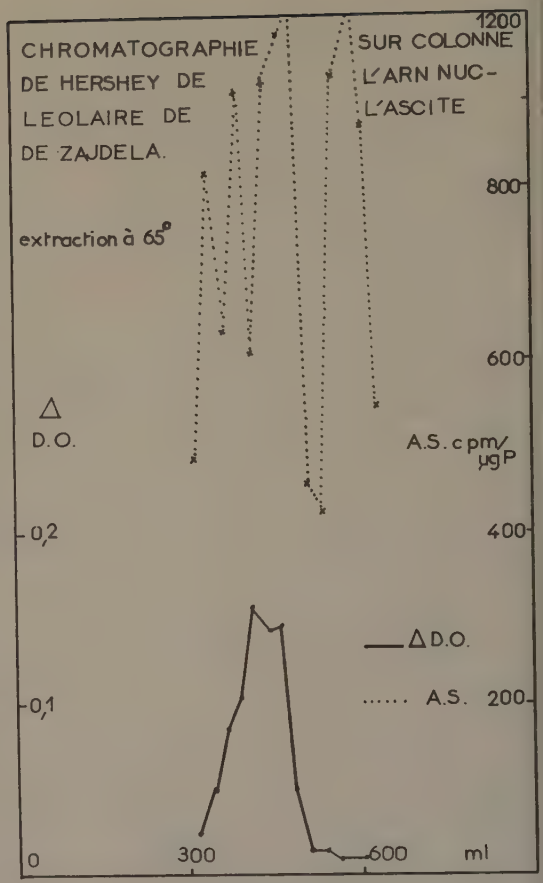


FIGURE 38

qu'elles nous révèlent une hétérogénéité de marquage aussi bien dans les nucléoles des noyaux hépatiques normaux que tumoraux. L'AS ARN nucléolaire de la tumeur pour les mêmes délais est régulièrement plus élevée que celle du foie, indiquant une synthèse intense d'ARN.

Finalement, nous avons étudié l'incorporation de $^{32}PO_4'''$ comparativement dans l'ARN des différentes fractions subnucléaires du foie normal et de l'hépatome ascitique, marquées *in vivo* (pendant 2 heures 30 minutes, après injection par voie intrapéritonéale de $^{32}PO_4'''$ à raison de 300 µc par 100 g de poids corporel). Les fractions d'ARN ont été étudiées après hydrolyse selon SCHMIDT et THANNHAUSER (332) et purification par absorption sur charbon. Il s'est avéré en effet qu'il existe (voir exemple figurant dans le tableau 23) dans les ARN de différents compartiments nucléaires du foie et de l'hépatome de Zajdela, un PO_4''' hautement radioactif non nucléotidique.

Il est constitué par du PO_4''' minéral et des composés phosphoprotéiques et phosphatidopeptidiques qui ne sont pas retenus par les colonnes de charbon. Ces résultats montrent, comme il a souvent été discuté (362), la nécessité d'une étape de purification pour la détermination valable des AS ARN. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 29. Il ressort de l'examen de la figure 29 que dans les noyaux hépatiques normaux et tumoraux les AS ARN des fractions nucléolaires sont les plus élevées. A ce délai de marquage, l'ARN de la fraction chromosomale incorpore plus que celui du suc nucléaire. Comme on pouvait s'y attendre, l'intensité des synthèses est plus forte dans le noyau cancéreux que dans le noyau normal.

D'après l'étude du renouvellement de l'ARN des diverses fractions subnucléaires, il ressort que le nucléole joue un rôle important dans la biosynthèse d'ARN nucléaire dans les noyaux hépatiques normaux et pathologiques étudiés, vu les fortes activités spécifiques enregistrées au niveau du nucléole. C'est bien dans ce compartiment nucléaire que Sibatani et collaborateurs (354) ont mis les premiers en évidence, pour la cellule animale, un ARN à composition voisine de l'ADN. Peut-on extrapoler et dire que le «site» de la biosynthèse de l'ARN nucléaire est le nucléole? Nous ne le pensons pas. L'école russe de Georgiev (129 - 131) a démontré, avec une méthode de fractionnement différente que la synthèse d'ARN à métabolisme très rapide et à composition proche de celle de l'ADN s'effectue au niveau de l'appareil nucléolo-chromosomal. Ces auteurs ne séparent pas les nucléoles des chromosomes.

Nombreux sont les travaux d'autoradiographie, [Errera (106), Perry (300), Prescott (307), Amano (7)] utilisant les précurseurs radioactifs comme l'uridine ou la cytidine tritiée sur du matériel varié, qui ont montré, par des comptages de grains, un marquage très intense du nucléole, et qui font conclure au rôle primordial du nucléole dans la synthèse d'ARN nucléaire. Mais en tenant compte de la radioactivité totale incorporée et non des activités spécifiques au niveau des chromosomes, on montre aussi qu'il y a synthèse d'ARN au contact des chromosomes [Gall et Callan (127)] concomittante à celle du nucléole; cet ARN, d'origine chromosomale, peut être transféré dans le cytoplasme (120 - 127). D'après les expériences de Goldstein et Micou (138) selon lesquelles les cellules Hela incorporent la cytidine H^3 au début de l'incubation pendant un délai très court, dans les chromosomes et seulement ensuite dans le nucléole, le «site» de la biosynthèse de l'ARN nucléaire serait les chromosomes. Les études de Rho et Bonner (320) sur des noyaux isolés de pousses de pois incubées *in vitro* en présence des quatre ribosides triphosphates, ont montré que la synthèse d'ARN débute dans la chromatine et que l'ARN est transféré dans le nucléole. Enfin, parmi les données d'enzymologie, citons l'existence de la RNA polymérase de Weiss (397) qui est DNA dépendante. Fujita et Takamoto (120) ont vu que la synthèse d'ARN n'est pas uniforme le long des chromosomes, mais qu'il y a incorporation intense

de précurseurs au niveau des interbandes. Dans la même optique, citons que Huang et Bonner (182) ont trouvé que l'histone complexant l'ADN de la chromatine de plants de pois est un suppresseur de la synthèse d'ARN chromosomal. C'est la portion d'ADN non occupée par l'histone qui est métaboliquement active dans la biosynthèse de l'ARN chromosomal.

Ce sont les travaux basés sur la micro-irradiation aux U.V. de noyaux effectués par Montgomery (271) et par un laboratoire belge (41 - 106 - 299) qui ont apporté quelques précisions sur la biosynthèse dans les deux compartiments nucléaires. L'énucléolation de cellules Hela produit une diminution très importante (70% environ) mais jamais totale de la biosynthèse d'ARN cytoplasmique. C'est un argument en faveur d'un transfert d'ARN nucléolaire vers le cytoplasme. Le noyau énucléolé incorpore moins de précurseur radioactif qu'un noyau indemne. Ces expériences prouveraient l'existence de deux sites de synthèse d'ARN dans le noyau: le nucléole, qui contrôle en partie la synthèse d'ARN cytoplasmique, et les chromosomes. Il semble donc que le nucléole n'ait pas simplement une fonction d'accumulateur ou de stockage d'ARN synthétisé par les chromosomes. Adams et Busch (3), dans leur étude de l'ARN nucléaire du foie de rats traités à la thioacétamide, composé qui provoque l'hypertrophie de nucléoles avec une augmentation d'ARN et de protéines, ont montré: d'une part, que la thioacétamide inhibe l'incorporation d'acide orotique -6-C-14 dans l'ARN nucléaire total et d'autre part, que seule la faible fraction d'ARN nucléolaire non extractible par la méthode au phénol, l'ARN messager de Sibatani (354) est légèrement inhibé. Le métabolisme de la fraction d'ARN qui passe dans la phase aqueuse au cours de l'extraction au phénol n'est pas influencé. Ces résultats suggèrent une synthèse indépendante des deux sortes d'ARN nucléolaire et de celle au niveau des chromosomes. Les données apportées par Sirlin et collaborateurs (361), selon lesquelles les nucléoles de glandes salivaires de larves de *Smittia* traitées au 4, 5, 6-trichloro 1-β-D ribofuranosylbenzimidazole continuent à incorporer le précurseur marqué en l'absence de synthèse d'ARN chromosomal, font aussi pencher vers l'idée d'une synthèse d'ARN nucléolaire indépendante. Mais, si on se souvient que les études cytologiques ont montré que ce sont les chromosomes responsables de la formation des nucléoles, on voit que la notion d'indépendance des deux compartiments subnucléaires n'est que relative.

De nos résultats il ressort, en outre, que c'est la fraction d'ARN qui n'est pas extractible par la méthode au phénol qui est la plus radioactive. Il semble que la technique d'extraction au phénol (130 - 303 - 353 - 354 - 375) soit vraiment une technique qui permette de séparer les ARN tissulaires en deux classes chimiquement et métaboliquement distinctes: l'une extractible par la méthode au phénol est quantitativement plus importante et l'autre, non extractible, présente en faible quantité, est métaboliquement très active.

3° MISE EN EVIDENCE D'UN COMPLEXE ARN - ADN DANS LE COMPARTIMENT CHROMOSOMAL DU NOYAU DE FOIE ET DE L'HEPATOME ASCITIQUE DE ZAJDELA.

Nous avons noté qu'il existe dans la fraction chromosomale une proportion importante (qui atteint environ 30% dans le noyau de foie, 20% dans le noyau de l'hépatome de l'ARN nucléaire total) d'ARN qui accompagne l'ADN dans le fractionnement subnucléaire. Ainsi quand on isole l'ARN de la fraction chromosomale par la technique au phénol en présence de dodécylsulfate, on extrait toujours en même temps une très forte proportion d'ADN.

Dans les études de sédimentation en gradient de saccharose et de chromatographie sur colonne d'albumine méthylée, l'ensemble ARN - ADN se comporte comme un pic homogène.

Nous avons constaté que seule l'hydrolyse alcaline selon SCHMIDT et THANNHAUSER (332) suivie de précipitation de l'ADN en milieu acide permettait la séparation totale de l'ARN et de l'ADN dans la fraction chromosomale.

Nous avons procédé à des digestions RNAsiques sur les acides nucléiques isolés par la méthode au phénol de la fraction chromosomale dans les conditions déjà décrites. Nous avons opéré soit avec des concentrations élevées d'enzymes (10 à 100 μg/ml) soit en refaisant une deuxième digestion RNAsique avec une nouvelle dose d'enzyme. Les concentrations d'enzyme utilisées étaient suffisantes pour hydrolyser dans les mêmes conditions expérimentales 90% d'un ARN microsomal. Nous avons pris la précaution d'inactiver la DNAse qui existe à l'état de traces dans nos préparations RNAsiques par chauffage à 65° pendant 10 minutes (256). La RNAse ne perd pas de son activité dans ces conditions. La digestion RNAsique a été suivie d'hydrolyse alcaline pour déterminer la quantité d'ARN qui résiste à la RNAse.

Dans d'autres essais, nous avons effectué parallèlement avant l'hydrolyse alcaline un traitement à la DNAse. Par ailleurs, dans une série d'essais, avant de procéder à des hydrolyses enzymatiques ou alcalines, nous avons soumis des parties aliquotes des acides nucléiques de la fraction chromosomale à un chauffage à 100° pendant 15 minutes dans le but de dénaturer le DNA, de rompre les liaisons hydrogènes et de défaire la double hélice, pour permettre la libération de l'ARN de l'ADN. Lors du chauffage à 100° nous avons opéré en milieu tampon acétate pH 5,1 à 0,01 M en présence de traces de PVS pour inhiber l'action d'une éventuelle RNAse endogène. Le chauffage a été suivi, soit d'un refroidissement brusque dans un mélange glace-méthanol, soit d'un refroidissement très lent selon SCHILDKRAUT et collaborateurs (330 - 331). Dans le premier cas, il s'agissait de saisir les deux constituants nucléiques sous forme séparée, dans le deuxième cas, on espérait refaire la combinaison des deux types d'acides nucléiques telle qu'elle existe naturellement, sans chauffage de la préparation.

Nos résultats sont consignés dans les tableaux 26 et 27. Il en ressort, aussi bien pour le foie que pour l'hépatome, qu'une partie de l'ARN de la fraction chromosomale résiste à la RNAse. Le chauffage à 100° suivi de refroidissement rapide rend l'ARN de cette fraction nucléaire sensible à l'action de la RNAse. Par contre, si l'on effectue un refroidissement progressif après le chauffage à 100°, la digestion par la RNAse est notablement atténuée. L'ARN devient hydrolysable par la RNAse après traitement préalable à la DNAse.

L'ensemble des données conduit à conclure à l'existence d'un hybride naturel dont la quantité correspond au moins à la fraction d'ARN qui a été digérée par la RNAse, après chauffage et refroidissement brusque. Le taux plus ou moins élevé d'ARN attaqué par la RNAse dans notre préparation initiale (sans traitement thermique) dépend évidemment de la fraction d'ARN non associée à l'hybride qui le contamine et qui est extrait en même temps. Le fait que la résistance à la RNAse n'est pas maintenue entièrement après refroidissement lent peut être dû au fait que la reconstitution de l'hybride après chauffage est incomplète. Nous avons vérifié que le chauffage d'un ARN d'origine cytoplasmique, dans nos conditions expérimentales, n'augmente pas la sensibilité à la RNAse de cet ARN.

Nous avons aussi préparé les noyaux par la technique à l'acide citrique, dérivée de celle de Dounce (100) en présence de PVS. C'est une méthode plus rapide que celle au saccharose 2,2 M, et qui présente l'avantage, pour cette étude de l'ARN lié à l'ADN, d'inhiber au cours de la préparation l'action de la DNAse. Les résultats obtenus par cette voie sont similaires aux résultats précédents.

Comme suite à notre travail, l'hybride ARN-ADN a été isolé de la tumeur de Zajdela dans notre laboratoire [Borkowska (246)] par chromatographie sur colonne d'albumine méthylée.

Nous avons également montré l'existence de l'hybride ARN-ADN dans d'autres cellules que le foie. La figure 39 représente une chromatographie sur colonne de Hershey d'un hybride ARN-ADN du rein.

Nos résultats démontrent l'existence naturelle d'hybride ARN-ADN dans les cellules d'animaux supérieurs. Spiélmann (364 - 365a) et son école concluent à l'existence d'hybride naturel dans E. Coli infecté par le phage T_2 quoique la validité de l'expérience de Spiegelmann ait été mise en doute par Konrad et Stent (215a). Schulmann et Bonner (349) mettent en évidence l'hybride ARN-ADN dans *Neurospora crassa.*

Depuis que nous avons obtenu nos résultats, Hill et collaborateurs (169) lors de l'étude de l'ARN rapidement marqué de cellules HeLa soupçonnent la présence d'hybride ARN-ADN, sans en fournir la moindre preuve. Récemment Mead (262) a montré l'existence d'hybride naturel d'ARN-ADN. Enfin Mc Farlane et Fraser (239) viennent de produire un hybride ADN-SRNA de cellules ascitiques d'Ehrlich, et Mc Conkey et Hopkins (236a) des complexes ADN-ARN 28 S de cellules HeLa in vitro.

TABLEAU 26

ETUDE DE LA SENSIBILITE A LA RNASE DE L'ARN DE LA FRACTION CHROMOSOMALE

Exp.	Origine nucléaire	Etude	Natif	Chauffage 15 mn à 100°, refroidissement		% ARN hydrolysé par:	
				rapide	lent	RNAse	NaOH
1	foie	noyaux incubés in vitro	+	-	-	18,0	82,0
			-	+	-	47,5	52,5
			-	-	+	28,0	72,0
2	foie	in vivo	+	-	-	11,0	89,0
			-	+	-	55,0	45,0
3	foie *	in vivo	+	-	-	54,0	45,8
			-	+	-	96,5	3,5
4	hépatome de Zajdela	cellules incubées in vitro	+	-	-	28,2	71,8
			-	+	-	72,7	27,3
5	hépatome de Zajdela	cellules incubées in vitro	+	-	-	23,0	77,0
			-	+	-	67,8	32,2
6	hépatome de Zajdela	cellules incubées in vitro	+	-	-	18,2	81,8
			-	-	+	23,0	77,0

*noyaux isolés à l'acide citrique - pour les autres expériences les noyaux ont été isolés avec du saccharose 2,2 M.

TABLEAU 27

ETUDE DE LA SENSIBILITE A LA RNASE DE L'ARN DE LA FRACTION CHROMOSOMALE.

Origine des noyaux	Température Extraction au phénol	Quantité ARN libérée par RNAse		Quantité ARN hybride µg P ARN	Quantité ADN de la préparation µg P ADN	Fraction ARN associée hybride p. 100 de P ADN
		sans chauf. préalable µg P ARN	après chauf. et refroid. rapide µg P ARN			
ascite	47°	6;9	26,1	19,2	152	12,6
ascite	47°	6,7	17,3	10,6	64	16,6
ascite	47°	3,2	9,4	6,2	117	5,3
foie ++	20°	55,8	83,6	27,8	364	7,7
foie ++	47°	22,6	40,2	17,6	187	9,4
foie +	47°	3,5	9,2	5,7	48,4	11,8
foie +	47°	4,5	7,4	3,0	41,9	7,4

Origine des noyaux	Température Extraction au phénol	Quantité ARN libérée par		Quantité ARN hybride µg P ARN	Quantité ADN de la préparation µg P ADN	Fraction ARN associée hybride p. 100 de P ADN
		RNAse µg P ARN	DNAse + RNAse µg P ARN			
foie +	0°	6,1	30,0	23,9	246	9,7
foie +	25°	12,7	23,6	10,9	268	4,1
foie +	47°	3,4	13,4	10,0	70,5	14,2

+ noyaux isolés par la saccharose 2,2 M
++ noyaux isolés à l'acide citrique.

TABLEAU 28

COMPARAISON DE L'AS ADN CHROMOSOMAL ET DE L'AS ADN NUCLEOLAIRE DANS LE NOYAU DE FOIE.

N°	Origine nucléaire	précurseur	durée de marquage	étude	fraction nucléaire	AS ADN cpm/µg P
1	foie	$^{32}PO_4^{'''}$	2 h 30	in vivo	chromosomale nucléolaire	52 1000
2	"	"	"	"	chromosomale nucléolaire	57 3930
3	"	"	"	"	chromosomale nucléolaire	242 3350
4	"	"	"	"	chromosomale nucléolaire	143 7630
5	"	"	"	"	chromosomale nucléolaire	32 2780
6	"	"	3 h	"	chromosomale nucléolaire	96 2002
7	"	H^3 Thymidine	1 h	in vitro	chromosomale nucléolaire	21 90
8	"	"	3 h	in vivo	chromosomale nucléolaire	33 540
9	"	"	"	"	chromosomale nucléolaire	1110 2100

TABLEAU 29

COMPARAISON DE L'AS ADN CHROMOSOMAL ET DE L'AS ADN NUCLEOLAIRE DANS LE NOYAU DE L'HEPATOME DE ZAJDELA.

N°	Origine nucléaire	précurseur	durée de marquage	étude	fraction nucléaire	AS ADN cpm/µg P
1	hépatome de Zajdela	$^{32}PO_4^{'''}$	30 mn	in vitro	chromosomale nucléolaire	76 5420
2	"	"	"	"	chromosomale nucléolaire	143 3580
3	"	"	1 h	in vivo	chromosomale nucléolaire	173 3300
4	"	"	2h 30	"	chromosomale nucléolaire	355 1320
5	"	H^3 Thymidine	1h 30	"	chromosomale nucléolaire	278 378
6	"	H^3 Thymidine	2 h	in vitro	chromosomale nucléolaire	505 640

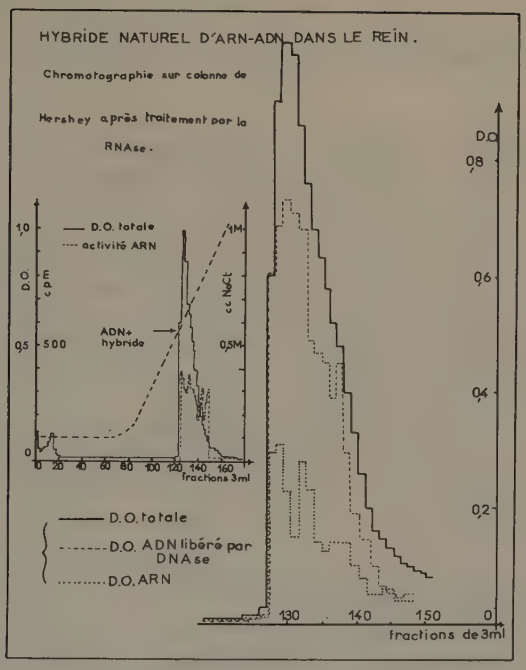


FIGURE 39

Les caractéristiques que nous avons notées pour l'hybride naturel sont semblables à celles obtenues par YANKOFSKY et SPIEGELMANN (405) et par GROS et collaborateurs (151) sur des hybrides bactériens.

En conclusion, signalons encore que, dans un travail en cours, nos premières analyses de bases, ont montré que l'ARN hybridisé de foie avait un rapport C + G / A + U de l'ordre de 0,8 à 0,9. Cette valeur est très voisine du rapport C+ G / A + T de l'ADN et beaucoup plus faible que le rapport de l'ARN nucléaire total (supérieur à 1,4) où prédomine l'ARN du type ribosomal. Cette composition en bases de l'ARN est un solide argument en faveur de l'existence naturelle d'hybride ARN-ADN dans le foie.

4° COMPARAISON DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE L'ADN CHROMOSOMAL ET DE L'ADN NUCLEOLAIRE.

En contrôlant la validité de notre méthode de fractionnement subnucléaire, nous avons mis en évidence la présence de petites quantités d'ADN dans la fraction nucléolaire et dans le suc nucléaire, soit en dehors de la fraction chromosomale. Nous avons constaté d'une façon systématique (dans six expériences portant sur le foie et dans six expériences concernant l'hépatome de Zajdela) que l'AS ADN du nucléole était extrêmement élevée, comparée à celle de l'ADN chromosomal ou de celui du suc nucléaire, déterminées après hydrolyse alcaline et séparation de la fraction désoxyribonucléique. Les valeurs moyennes étaient respectivement pour le foie de 3.500 cpm/µg PADN pour AS ADN nucléolaire contre 60 cpm/µg PADN pour AS ADN chromosomal. Pour l'hépatome ascitique, l'AS ADN nucléolaire s'élevait à 10.000 cpm/µg PADN contre 500 cpm/µg PADN pour l'AS ADN chromosomal.

Nous avons alors procédé à des purifications rigoureuses de l'ADN de ces deux fractions subnucléaires afin de nous assurer qu'il s'agit d'un artéfact ou d'un phénomène réel. Notre façon d'opérer est celle que nous avons précédemment utilisée pour l'étude de l'ADN qui quitte le noyau au cours de l'incubation *in vitro* (voir figure 18). Rappelons que nous avons déterminé les activités spécifiques sur les oligodésoxynucléotides libérés par la DNAse, après élimination successive de l'ARN par hydrolyse alcaline complétée par hydrolyse enzymatique.

Les résultats de nos essais pour les deux types de noyaux analysés se trouvent dans les tableaux 28 et 29. Il en ressort que l'ADN du nucléole est plus intensément marqué que les ADN des chromosomes, autant pour les délais de marquage courts que pour des délais plus longs. Ce fait se retrouve quand on utilise comme marqueur soit le $^{32}PO_4'''$ ou la thymidine tritiée dans les deux sortes de noyaux étudiés. Les différences enregistrées sont plus élevées pour tous les essais utilisant comme traceur le $^{32}PO_4'''$. La différence entre l'incorporation de la thymidine tritiée et le $^{32}PO_4'''$ s'explique tout d'abord par le fait que la thymidine tritiée, quoique précurseur plus spécifique de l'ADN marque seulement un nucléotide et le $^{32}PO_4'''$ s'incorpore dans les quatre nucléotides; et, l'activité spécifique du pool de précurseur est plus élevée pour le $^{32}PO_4'''$ que celle du pool de la thymidine. Or, les équilibres isotopiques de toutes les étapes intermédiaires franchies par le précurseur radioactif pour être finalement incorporé dans la chaîne polynucléotidique sont fonction de l'activité spécifique du pool des précurseurs. De plus, l'activité de la thymidine kinase étant relativement faible dans le foie, on conçoit que la thymidine tritiée s'incorpore moins bien que le $^{32}PO_4'''$ minéral.

La mise en évidence d'une fraction d'ADN dans le compartiment nucléolaire, à renouvellement différent de l'ADN chromosomal, est un fait nouveau.

Il existe pourtant des données cytologiques qui parlent en faveur d'une fraction d'ADN localisée au niveau du nucléole. C'est Furieri (123) qui, le premier, l'a désignée sous le nom de chromatine nucléolo-associée dans son étude des nucléoles de divers mammifères. D'autres auteurs, Sirlin (359), Stitch (370), Vincent (385), Zajdela (409) notent l'existence d'hétérochromatine périnucléolaire. Furieri (123). Lettre et Siebs (227), O'Donnell (291) trouvent des réactions Feulgen positives pour des zones intranucléolaires. Plus récemment, Herich (164) a pu mettre en évidence trois structures à caractéristiques biochimiques différentes dans les nucléoles de racine de *Vicia faba* : l'une constituée en majeure partie par de l'ARN, la deuxième contenant une certaine proportion d'ADN localisée sur une troisième structure qui possède les caractéristiques des protéines. Zajdela (410) a observé au microscope électronique que les nucléoles de noyaux de l'hépatome qui porte son nom était hypertrophiés avec de larges masses périnucléolaires d'ADN. Maggio et ses collaborateurs (242) ont montré l'existence de chromatine périnucléolaire et de chromatine à l'intérieur de vacuoles nucléolaires. Desjardins (95) de l'école de Busch, isolant les nucléoles de tissus de rats après rupture de la membrane nucléaire par la French Press, a vu : que les nucléoles du carcinosarcome de Walker sont de forme plus irrégulière que les nucléoles de noyaux hépatiques et ont la même ultrastructure qu'un nucléole *in situ*, c'est-à-dire comportant de la chromatine nucléoloassociée. Postérieurement à notre travail, Granboulan et Granboulan (140) dans une étude cytochimique ultrastructurale du nucléole de noyaux de rein de *Cercophithecus aetiops sabeus* ont montré l'existence de lames chromatiniennes intranucléolaires. La surface de contact entre l'ADN et les composants nucléolaires apparaît très étendue. Smetana et Busch (363) viennent de confirmer par microscopie électronique la présence de structure d'ADN dans le nucléole hépatique.

S'il y a des preuves historadiographiques et cytologiques pour admettre l'existence de chromatine dans le nucléole, il n'y a aucune donnée biochimique concernant la présence et la caractéristique particulière d'un ADN nucléolaire. Monty (273) et Rees (316) et collaborateurs ont signalé d'importantes quantités d'ADN dans la fraction nucléolaire mais, pour ces auteurs, il ne faisait pas de doute qu'il s'agit de contamination chromosomale. Notons en passant que l'historadiographie à elle seule à l'aide de $^{32}PO_4'''$ est évidemment discutable car elle ne répond pas aux critères de purification qu'on a pu effectuer avec des méthodes biochimiques.

C'est seulement après purification poussée des nucléoles isolés que l'on pourra aborder des recherches concernant le rôle de cet ADN particulier. Nous penchons à croire que cette fraction d'ADN à turnover

très rapide intervienne pour une part importante dans la biosynthèse de l'ARN nucléolaire par analogie aux nombreuses données de la biologie moléculaire où on connaît le rôle de l'ADN en tant que support de l'information génétique dans la synthèse de l'ARN. Rappelons que le principal argument invoqué contre la fonction spécifique du nucléole était que ce compartiment nucléaire ne possède pas à proprement parler de l'ADN (360 - 361). On pourrait imaginer que l'ADN nucléolaire à renouvellement plus intense que l'ADN chromosomal serve de modèle à l'ARN à renouvellement rapide mis en évidence par Sibatani (354), Revel (319) et nous-mêmes, parallèlement à la synthèse d'ARN chromosomal orientée vers la production d'ARN messagers divers. Nous avons pensé que cet ADN nucléolaire pourrait jouer un rôle dans la biosynthèse de l'ARN ribosomal ou préribosomal à renouvellement très rapide. Le renouvellement de cet ADN pourrait être en rapport avec la notion qui résulte des expériences de Spiegelmann et Yankofsky (365 - 406) que le fragment transcrit pour la synthèse des ribosomes est reproduit avec une fréquence infiniment plus grande que les autres chaînes de l'ADN produisant l'ARN messager, afin d'assurer la quantité importante d'ARN ribosomal de la cellule. Ainsi pourrait apparaître la notion de semi-autonomie et de spécificité de synthèse des deux compartiments nucléolaire et extranucléolaire.

A la suite de nos données et d'hypothèses formulées, nous avions abordé des essais d'hybridisation d'ADN nucléolaire et d'ARN ribosomal. L'obtention de quantités suffisantes d'ADN nucléolaire pur que nécessitent les essais d'hybridisation nous ont retardé dans notre travail. Mais tout récemment Mc Conkey et Hopkins (236a) ont réalisé des hybrides d'ARN 28S avec une fraction nucléaire enrichie en ADN nucléolaire de cellules HeLa. Ces faits suggèrent que cet ADN particulier code effectivement pour l'ARN ribosomal.

Indépendemment à la même époque, dans notre équipe de recherches, Borkowska (246) a mis en évidence dans l'hépatome de Zajdela, par chromatographie sur colonne d'albumine méthylée, un petit pic subsidiaire particulier. Ce pic s'élue à une concentration en NaCl supérieure à celle qui correspond à l'ARN-ADN qui est quantitativement beaucoup plus important. Le pic subsidiaire contient à la fois de l'ADN et de l'ARN lourd. Il s'agit là sans doute de l'ADN nucléolaire et de son hybride naturel.

III. — RÉGULATION A L'ECHELLE TISSULAIRE OU DE L'ORGANISME DE L'ANIMAL.

A. — *Etude quantitative des acides nucléiques et leur renouvellement dans l'hépatome de* ZAJDELA *et dans le foie chez le même animal.*

Pour visualiser la différence globale entre une cellule hépatique au repos et une cellule cancéreuse tirant son origine du foie et qui lui est restée morphologiquement très proche, nous avons tout d'abord comparé les quantités d'acides nucléiques présentes dans l'hépatome ascitique de Zajdela et dans le foie du même animal.

Parallèlement a été étudié le renouvellement des acides nucléiques en analysant l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans l'ARN et l'ADN. Etant donné l'importance des régulations hormonales et nutritionnelles des biosynthèses des ARN nous nous sommes placés dans des conditions qui nous ont paru optimales puisque nous sommes à même de confronter chez le même animal les cellules hépatiques normales et les cellules d'hépatome relativement peu dédifférenciées.

1° RESULTATS.

Les résultats expérimentaux sont consignés dans les tableaux 30, 31, 32. La répartition des acides nucléiques a été exprimée par rapport aux protéines et en quantité absolue. Il ressort du tableau 30 qu'un rat porteur de l'hépatome de Zajdela synthétise en moyenne environ 18 mg d'ADN dans son ascite en l'espace de 6 jours. Il s'agit

donc d'une synthèse intense puisque la quantité d'ADN de la tumeur équivaut à celle d'un foie entier. Il n'en est pas de même quand on compare les valeurs absolues d'ARN néoformé par tumeur à celles du foie. La tumeur de Zajdela en produit moins, ce qui se traduit par un rapport ARN/ADN systématiquement plus faible ($p < 0,01$) dans l'hépatome par rapport à celui du foie chez le même animal. Ce rapport voisin de 4 dans le foie, n'atteint en moyenne que 1,4 dans la tumeur. Cette forte diminution du rapport ARN/ADN met en relief l'importance quantitative de l'ADN dans la cellule cancéreuse comparée à la cellule homologue normale. Il ressort également de nos résultats que la synthèse protéique comparée à celle de l'ARN est d'environ 44% plus faible ($p < 0,01$) dans la tumeur, ce qui témoigne d'un trouble de régulation considérable. Celui-ci est cependant encore plus accusé si on compare la néoformation de protéines et de l'ADN, la cellule d'ascite renferme quatre fois plus d'ADN que le foie pour une même quantité de protéines. La cellule cancéreuse possède par g de protéines une teneur d'ARN et d'ADN significativement plus élevée ($p < 0,01$) que le foie: les valeurs moyennes du P ARN sont pour l'hépatome 6,21 mg $\pm$ 0,90 contre 4,31 mg $\pm$ 0,57, soit une augmentation de 44%. La valeur moyenne de la teneur en P ADN de la cellule ascitique est 4,23 mg $\pm$ 0,61 contre 1,10 mg $\pm$ 0,18 dans la cellule hépatique, ce qui correspond à une moyenne plus élevée de 300% environ. Dans les tableaux 32 et 33 figurent les résultats concernant l'incorporation de $^{32}PO_4'''$ dans les acides nucléiques de la tumeur de Zajdela et dans le foie de l'animal porteur de l'hépatome. Comme on pouvait s'y attendre les ASR ARN de l'hépatome sont très supérieures à celles du foie ($p < 0,01$). En ce qui concerne l'ADN, l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ reflète dans la tumeur d'une néosynthèse très intense dont nous avons déjà parlé; mais il est difficile de faire la comparaison avec le foie dans lequel une faible fraction d'acides désoxyribonucléiques se renouvelle comme nous allons le voir plus loin. Notons toutefois que l'AS PO_4''' est en moyenne très voisine dans le foie et dans la tumeur ($p > 0,05$).

2° DISCUSSION DES RESULTATS.

Il n'est guère besoin de rappeler la constatation faite par de nombreux auteurs (23 - 44 - 97 - 101 - 107 - 111 - 121 - 259 - 342 - 343) que les cellules cancéreuses sont riches en acides nucléiques et en particulier en ADN. Khouvine (204) constate que dans les hépatomes induits par le jaune de beurre, l'ADN augmente beaucoup plus que l'ARN. Divers auteurs (90 - 265 - 279 - 342 - 310) ont également observé un quotient ARN/ADN diminué dans les hépatomes induits par le diméthylazobenzène par rapport au foie. Cependant dans ce dernier cas, le foie et les cellules tumorales étaient soumises à une intoxication chronique par le cancérogène pendant de longues durées. Dans nos conditions expérimentales ce facteur est éliminé. L'évolution de la tumeur maligne

s'effectue dans un délai bref sans administration d'agent pharmacologique quelconque. Cependant cette réduction de rapport ARN/ADN n'est pas spécifique des hépatomes, puisque LE PAGE et collaborateurs (226) trouvent un rapport ARN/ADN très diminué dans le sarcome de Flexner-Jobling par rapport au quotient ARN/ADN du foie chez ces mêmes animaux. Mais dans ce cas la comparaison ne s'effectue pas sur des cellules homologues. Notons que nos rapports ARN/ADN du foie normal concordent avec ceux de la littérature en particulier avec ceux de FUKUDA (122), SCHMIDT (332), THOMSON (379), MANDEL (247) et leurs collaborateurs. Les résultats que nous avons rapportés, illustrent l'avantage d'opérer sur le même animal avec le même type morphologique de cellules, contrairement à ce qui a été fait par différents auteurs qui ont comparé le contenu ou le renouvellement des acides nucléiques du foie et des tumeurs d'origine totalement différente. Nous avons également la certitude que le foie servant de base de référence

TABLEAU 30

ETUDE QUANTITATIVE DES ACIDES NUCLEIQUES DES CELLULES DE L'HEPATOME ASCITIQUE DE ZAJDELA ET DES CELLULES DU FOIE CHEZ LE MEME ANIMAL.

N° Exp.	Nombre rats	Organe	mg de P par g de protéines		ARN / ADN	mg de P par rat	
			ARN	ADN		ARN	ADN
1	2	foie	3,97	1,02	3,90	6,97	1,78
		ascite	6,43	5,43	1,18	2,07	1,75
			+62%	+432%	-67%	-70%	- 1%
2	2	foie	3,97	1,03	3,84	8,10	2,11
		ascite	5,62	4,10	1,37	2,85	2,08
			+42%	+298%	-64%	-65%	- 1%
3	2	foie	4,05	1,20	3,36	4,90	1,46
		ascite	5,23	3,96	1,32	1,89	1,43
			+29%	+230%	-61%	-61%	- 2%
4	3	foie	5,46	1,43	3,82	7,04	1,85
		ascite	7,13	4,11	1,72	3,23	1,86
			+30%	+187%	-55%	-54%	+ 1%
5	3	foie	4,70	0,94	4,98	6,45	1,29
		ascite	7,00	4,49	1,56	2,27	1,45
			+49%	+376%	-69%	-65%	+12%
6	5	foie	4,07	1,10	3,68	5,97	1,63
		ascite	6,98	4,56	1,53	2,44	1,65
			+72%	+315%	-58%	-59%	+ 1%
7	8	foie	3,96	1,01	3,91	5,30	1,36
		ascite	5,14	3,56	1,44	2,29	1,59
			+30%	+253%	-63%	-57%	+17%

TABLEAU 31

ETUDE COMPAREE DE L'INCORPORATION DE $^{32}PO_4'''$ DANS LES ACIDES NUCLEIQUES DE L'HEPATOME ASCITIQUE DE ZAJDELA ET DES CELLULES DU FOIE CHEZ LE MEME ANIMAL.

N° Exp.	Nombre rats	Organe	AS PO_4'''	ASR ARN	ASR ADN
1	2	foie	358	0,382	0,072
		ascite	389	0,610	0,457
			+ 8%	+60%	+536%
2	2	foie	490	0,302	0,073
		ascite	539	0,431	0,286
			+10%	+43%	+296%
3	2	foie	433	0,314	0,077
		ascite	507	0,456	0,329
			+17%	+45%	+328%
4	3	foie	1070	0,380	0,037
		ascite	1300	0,423	0,255
			+21%	+11%	+590%
5	4	foie	418	0,416	0,073
		ascite	477	0,497	0,388
			+14%	+20%	+432%
6	5	foie	490	0,377	0,112
		ascite	508	0,552	0,525
			+ 4%	+46%	+368%
7	8	foie	449	0,433	0,150
		ascite	486	0,613	0,418
			+ 8%	+42%	+178%

TABLEAU 32

ETUDE COMPAREE DES ACIDES NUCLEIQUES DE L'HEPATOME DE ZAJDELA ET DU FOIE CHEZ LE MEME ANIMAL.

	P par g de protéines		P par rat		$\frac{ARN}{ADN}$	AS PO_4'''	ASR ARN	ASR ADN
	ARN	ADN	ARN	ADN				
Rapport moyen $\frac{Ascite}{foie}$ de 7 exp.	1,44	3,98	0,38	1,03	0,37	1,11	1,38	4,90
déviation standard	±0,21	±0,87	±0,16	±0,35	±0,22	±0,13	±0,17	±0,41
résultat du test t de Fischer	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p < 0,01$	$p > 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$

représente un témoin valable dans nos expériences, alors que ce n'est pas le cas lorsqu'on opère sur des foies en voie de cancérisation, même si on sépare anatomiquement le tissus tumoral des parties saines en apparence qui peuvent cependant avoir subi des transformations biochimiques.

La différence d'évolution de l'ARN et d'ADN au cours de la prolifération tumorale qui apparaît d'une façon particulièrement nette en considérant le rapport ARN/ADN (2½ fois plus faible dans l'hépatome que dans le foie sain) est seulement en contradiction en apparence avec les résultats de CASPERSSON et collaborateurs (65 - 66), obtenus par des mesures histologiques. Ces auteurs insistent sur la richesse en ARN de la cellule tumorale. En fait dans les observations de CASPERSSON il s'agit d'une densité élevée d'ARN dans la cellule cancéreuse; mais il ne faut pas oublier, tel l'a montré SCHNEIDER (342) que le volume cytoplasmique dans l'hépatome est environ la moitié de celui du foie. En moyenne le noyau du foie occupe 6% du volume cellulaire alors que c'est plus que la moitié dans le cas de l'hépatome. L'enrichissement en ADN reflète évidemment d'une augmentation du nombre de chromosomes constatée par des observations histologiques. Mais c'est là une observation banale. Ce qui importe de souligner par contre, ce sont les quantités absolues considérables d'acides nucléiques synthétisées dans la tumeur lors du développement de l'hépatome, puisque l'ADN néoformé atteint la valeur en ADN du foie entier en l'espace de six jours. La quantité d'ARN produite relativement importante reste cependant moins forte, montrant que la synthèse dominante est celle de l'ADN et qu'elle n'est pas suivie par la néoformation d'ARN. De même le rapport ARN/ADN fortement diminué dans l'hépatome, reflète la différence fondamentale dans le métabolisme des acides nucléiques des deux types de cellules hépatiques, une à croissance normale, l'autre à croissance maligne.

L'étude de l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ a révélé de grandes différences entre le renouvellement des acides nucléiques de la cellule ascitique tumorale et la cellule hépatique normale. La valeur élevée de l'ASR ADN dans l'hépatome est bien l'indice de nombreuses mitoses; l'accroissement de l'ASR ARN met en évidence un métabolisme actif de l'ARN. Si cette augmentation de l'incorporation de $^{32}PO_4'''$ dans les cellules cancéreuses de types très différents constatée par divers auteurs (46 - 109 - 150 - 165 - 166 - 204 - 215 - 257) est une observation évidente, l'intérêt de nos données réside dans l'appréciation quantitative. Il est intéressant de noter que le renouvellement de $^{32}PO_4'''$ de la tumeur est de 44% en moyenne plus intense que celui du foie et qu'effectivement au 6e jour la néosynthèse nette d'ARN de la cellule tumorale représente aussi 44% de l'ARN du foie de l'animal.

Parmi les travaux montrant l'incorporation plus intense de précurseurs radioactifs des acides nucléiques dans différents néoplasmes citons Canterow et collaborateurs (61) qui ont trouvé une incorporation plus intense d'uracile-2-C-14 dans l'ARN de tumeurs telles le carcinome de Walker, le sarcome de Murphy et un lymphosarcome, que dans l'ARN des tissus normaux. Le plus grand renouvellement des acides nucléiques dans les tumeurs a été constaté par ailleurs par Zbarsky (413) et Nixon (288) qui trouve une incorporation accrue de formiate-C-14 dans l'hépatome de Novikoff, l'ascite d'Ehrlich et le carcinosarcome de Walker (256). Le Page et Heidelberger (225) constatent une nette augmentation d'incorporation de glycine-C-14 dans l'ADN et une plus faible dans l'ARN du sarcome de Jobling-Flexner. Tyner (382) observe que le même isotope marqué s'incorpore plus vite dans les acides nucléiques de la tumeur que dans ceux du foie, alors que c'est l'inverse pour l'incorporation dans les protéines. Mais les travaux d'Elwyn (103) avec la sérine-C-14 et ceux de Totter (380) effectués avec du formiate-C-14 ont montré une incorporation aussi forte dans l'ARN que dans l'ADN de foie normal, ce qui n'est pas le cas dans les expériences effectuées avec du $^{32}PO_4$''' où le renouvellement de l'ADN dans la cellule normale non en voie de division est très faible. Les résultats de l'administration simultanée de glycine-2-C-14 et d'adénine-8-C-14 de Furst (126) ont fait penser à l'existence d'au moins ~~de~~ deux mécanismes de synthèses d'ADN. Un des mécanismes implique l'intégration d'adénine préformée avec du désoxyribose et de l'acide phosphorique dans les acides nucléiques. Ce mécanisme fonctionnerait quand il y aurait synthèse nette d'ADN comme c'est le cas dans la tumeur de Zajdela. Le deuxième mécanisme, le plus usuel peut-être, ferait appel à l'incorporation de petites molécules de précurseurs de purines sur un chaînon où le désoxyribose et l'acide phosphorique sont déjà fixés et il se produirait à une vitesse telle qu'on assiste à une stabilité du DNA dans les tissus non en prolifération.

B. — *Constitution des ARN totaux du foie normal, de l'hépatome de* ZAJDELA *et de l'ascite de* NOVIKOFF.

Vu l'importance des acides nucléiques dans la transmission des informations codées, celle de l'homostasie des cellules normales et celle de la prolifération des cellules cancéreuses, nous avons jugé utile de procéder à une étude comparative de la constitution des ARN du foie normal, dont les cellules sont essentiellement au «repos», et des ARN de l'hépatome de Zajdela, tissu homologue à prolifération très rapide. La comparaison de la composition des acides nucléiques de

tissus normaux et néoplasiques ont conduit à des résultats divergents. Certains auteurs comme Butler (207), de Lamirande (220), Chargaff (74) et leurs collaborateurs ont surtout constaté une augmentation du GMP dans l'ARN total de tumeur par rapport aux tissus sains; d'autres chercheurs comme Kit (211) n'ont pas trouvé de différence qualitative dans l'ARN total de tumeurs comparé à celui d'un tissu normal. Devant le taux relativement faible de l'ARN du noyau par rapport à celui des autres fractions subcellulaires, nous nous sommes limités à la recherche de l'existence éventuelle de différences, en comparant soit l'ARN global du foie et de la tumeur homologue, soit l'ARN nucléaire.

Pour étudier les compositions en ribonucléotides des ARN nous nous sommes arrêtés à la séparation des nucléosides monophosphates après hydrolyse alcaline, par électrophorèse sur papier. Les détails techniques ont été donnés ailleurs. La répartition des ribonucléotides a été évaluée d'après le P dosé par voie chimique et d'après les absorptions aux U.V.

1° ETUDE COMPARATIVE DE LA COMPOSITION DE L'ARN TOTAL DU FOIE NORMAL, ISOLE DANS DIFFERENTES CONDITIONS EXPERIMENTALES.

En ce qui concerne l'ARN total du foie ou de l'hépatome la répartition des nucléotides a été déterminée après hydrolyse alcaline par électrophorèse sur papier selon les techniques indiquées plus haut. Le taux de nucléotides dans les spots isolés a été évalué par les dosages du Phosphore et par l'absorption dans l'Ultraviolet comme on a vu ci-dessus. Nous avons tout d'abord comparé les répartitions fournies par les échantillons d'ARN soit, obtenus sans extraction préalable de cet acide (Série A) d'après la technique de Schmidt et Thannhauser (332) un peu modifiée dans notre laboratoire, soit après extraction de l'ARN au phénol selon diverses variantes (Série B à E). La confrontation des résultats obtenus pour la composition de l'ARN global préparé suivant diverses techniques, nous a paru intéressante à faire, puisqu'on peut toujours formuler la critique que le fait d'isoler l'ARN risque de produire des pertes de certaines fractions d'ARN.

L'ARN du foie a été isolé pour les expériences de la série B suivant la technique décrite au chapitre Méthodes. C'est cette même technique qui a été utilisée pour l'étude de l'ARN de tumeur.

Pour la série C, l'ARN a été extrait au phénol comme selon le protocole des expériences de la série B mais en plus en présence de dodécylsulfate de Na à la concentration finale de 0,2% à la température de 50° C. Le surnageant aqueux est réextrait à la même température

successivement avec la moitié du volume, puis le quart du volume de phénol. L'ARN précipité comme dans les expériences de la série B est redissous et reprécipité deux fois avant d'être lavé et dialysé comme dans le cas des préparations de type B.

Pour la série D, la différence dans la méthode d'isolement de l'ARN de foie réside dans l'adjonction à l'homogénat de naphtalène disulfonate de sodium et de la 8 hydroxyquinoléine à raison de 0,5% et 0,1% respectivement avant l'extraction au phénol. On réextrait la phase aqueuse par un volume égal de phénol en présence de 8 hydroxyquinoléine.

Dans les expériences de la série E, les détails techniques modifiant la méthode utilisée dans la série B sont les suivants: Les foies congelés et broyés sont repris dans 5 à 6 volumes de bentonite à 2,5% préparé selon BROWNHILL (45). Le milieu est rendu 10-4 M pH 8 en complexon par adjonction de solution de complexon 0,1 M. La suite du mode opératoire est identique à celle de la série B. Pour éliminer la bentonite, on centrifuge en fin de manipulations l'ARN dissous à la Spinco à 105 000 g pendant une heure.

Nous avons utilisé des méthodes relativement douces qui ont pour but d'empêcher l'hydrolyse des liaisons entre les molécules constituant les nucléotides et les liaisons inter-nucléotidiques de façon à obtenir un ARN le moins dégradé possible. A cet effet il a fallu inhiber à chaque étape l'action de la RNAse. C'est pour ce point précis que nous avons effectué des changements de technique d'une expérience à l'autre. Dans toutes nos préparations, de la série B à E, nous avons utilisé le phénol, selon les indications de KIRBY (207), qui dénature les protéines et inhibe partiellement la RNAse. Dans les expériences de la série B nous avons ajouté au milieu du versène pour complexer les cations bivalents. En considérant la littérature on trouve tantôt des données conduisant à penser que le versène réduit le danger de dégradation (230 - 222 - 366), tantôt des expériences aboutissant à des conclusions diamétralement opposées (131a). Cela dépend en fait de la nature des RNAses en présence; leurs distributions et leurs activités respectives au sein des cellules est loin d'être connue. Aussi avons nous tenu compte des données de LITTAUER et collaborateurs (230 - 222) montrant que l'emploi de complexon conduit à un ARN de poids moléculaire supérieur à celui obtenu d'après la technique de KIRBY initiale (208). Pour les préparations C, l'ARN a été isolé en présence de dodécylsulfate de sodium et à 50°. Le dodécylsulfate, détergent qui désagrège et dénature les protéines, préconisé par BULL et NEURATH (48) a été utilisé par de nombreux auteurs à diverses concentrations soit pour l'isolement de protéines par FRAENKEL-CONRAT et RAMACHADRAN (116), soit pour l'isolement des acides nucléiques par KAY et DOUNCE (197), CRESTFIELD, SMITH et ALLEN (88) et beaucoup d'autres. L'emploi de naphtalène disulfonate de sodium dans la technique de l'isolement de l'ARN dans les expériences D conduit à un ARN moins

dégradé que celui préparé par la technique initiale d'après KIRBY (208 - 209). D'après le même auteur l'utilisation de la 8 hydroxyquinoléine favorise un bon rendement en ARN. Dans les expériences E nous avons extrait en présence d'une suspension de bentonite, argile à base de silicate d'aluminium, signalé par BROWNHILL (45) comme inhibiteur de la RNase et utilisé entre autre par FRAENKEL-CONRAT et collaborateurs (117 et 358).

Etant donné la nécessité de passer par une étape d'absorption sur charbon dans le but d'éliminer le P non nucléotidique, nous avons comparé pour les ARN isolés suivant différentes variantes, comme pour l'ARN obtenu par hydrolyse alcaline du résidu tissulaire (après extraction de l'acidosoluble et délipidation), les résultats obtenus avec et sans emploi de charbon. Les résultats des différentes préparations d'ARN du foie avec et sans passage sur charbon figurent dans le tableau 33. Les variations de constitution que nous avons constatées (Expérience B et C) lorsque les hydrolysats d'ARN ont été adsorbés sur colonnes de charbon par rapport à la constitution déterminée directement sont dues en général à une diminution du taux de GMP ($p < 0,05$). Les bilans effectués d'après les dosages dans les colonnes de charbon utilisées, montrent toujours que la récupération lors de

TABLEAU 33

COMPOSITION EN RIBONUCLEOTIDES DE L'ARN TOTAL DU FOIE NORMAL ISOLE DANS DIFFERENTES CONDITIONS.

(Les valeurs sont exprimées en molécules pour 100 molécules de nucléotides et suivies de la déviation standard précédée du signe ±).

\+ = détermination après adsorption sur colonne de charbon.
— = détermination sans adsorption sur colonne de charbon.

Exp.	Nombre de déterm.	Adsorption sur charbon	CMP	AMP	GMP	UMP
A	23	+	28,3 ± 3,5	18,9 ± 1,4	29,2 ± 2,7	23,6 ± 2,9
B	16	-	27,0 ± 3,0	18,8 ± 1,7	34,1 ± 2,9	20,1 ± 2,6
	11	+	28,7 ± 1,3	19,9 ± 1,4	31,7 ± 2,7	19,7 ± 2,7
C	24	-	28,6 ± 3,1	20,0 ± 2,1	32,3 ± 2,7	19,1 ± 2,6
	15	+	29,7 ± 3,6	19,7 ± 1,4	28,8 ± 2,9	21,8 ± 2,7
D	24	-	27,7 ± 2,9	20,0 ± 2,1	32,0 ± 2,7	20,3 ± 2,8
	8	+	29,3 ± 3,5	18,9 ± 0,5	31,3 ± 3,7	20,5 ± 2,2
E	24	-	28,3 ± 2,0	20,6 ± 2,5	32,1 ± 2,7	19,0 ± 2,4
	15	+	26,2 ± 3,3	21,7 ± 1,7	31,2 ± 2,2	20,9 ± 2,1

TABLEAU 34

COMPOSITION DE L'ARN DU FOIE DE RAT.

(Les valeurs sont exprimées en moles pour 100 moles de ribonucléotides).

Auteur	Référence	GMP	UMP	CMP	AMP
VOLKIN (1951)	(386)	32,8	15,2	34,0	18,0
DAVIDSON (1952)	(91)	33,2	20,6	27,4	18,8
		33,5	20,7	26,6	19,1
GROSBIE (1953)	(153)	35,6	16,5	27,6	20,3
		33,5	20,5	27,2	19,0
WERKHEISER (1953)	(393)	36,6	18,8	24,2	20,4
GOLD (1954)	(136)	32,2	27,8	18,4	21,1
LAMIRANDE (1955)	(220)	36,5	18,9	26,9	17,7
KIRBY (1956)	(207)	34	16,6	30,4	19
		34,5	16,7	29,6	19,2
		38,1	19,2	21,7	21,1
BUTLER (1956)	(56)	35,6	15,9	29,0	19,7
REDDY (1957)	(314)	27,6	23,8	30,7	17,9
PILERI (1958)	(302)	27,9	18,4	30,0	23,9
WEILL (1958)	(394)	31,1	21,6	27,1	20,2
SIBATANI (1960)	(353)	33,5	16,8	31,1	18,6
MONTREUIL (1961)	(272)	34,0	20,0	30,0	16,0
WINTZERITH		31,4	20,5	28,2	19,9

TABLEAU 35

COMPOSITION MOYENNE EN RIBONUCLEOTIDES DE L'ACIDE RIBONUCLEIQUE DU FOIE NORMAL, DE L'HEPATOME ASCITIQUE DE ZAJDELA ET DE L'ASCITE DE NOVIKOFF.

	nombre d'analyses	CMP	AMP	GMP	UMP	$\frac{Pu}{Py}$	$\frac{6\ amino}{6\ céto}$	$\frac{C+G}{A+U}$
Foie normal	160	28,2 ± 2,9	19,9 ± 1,6	31,4 ± 2,8	20,5 ± 2,5	1,05	0,93	1,48
Hépatome de Zajdela	42	30,9 ± 3,3	20,7 ± 2,2	27,1 ± 3,4	21,3 ± 1,7	0,92	1,07	1,38
Ascite de Novikoff	45	33,0 ± 1,5	21,4 ± 1,2	24,2 ± 1,6	21,4 ± 1,9	0,84	1,19	1,34

$$\frac{Pu}{Py} = \frac{GMP + AMP}{CMP + UMP} \qquad \frac{6\ amino}{6\ céto} = \frac{AMP + CMP}{GMP + UMP}$$

(Les valeurs sont exprimées en molécules pour 100 molécules de nucléotides et sont suivies de la déviation standard).

l'élution varie de 90% à 100%. Tout se passe comme si le GMP était en partie adsorbé d'une façon irréversible. Les préparations d'ARN des expériences D comme celles des expériences E ne montrent pas de différence significative ($p > 0,05$) après et sans passage sur charbon. Il importe cependant de se rendre compte que la simple comparaison des valeurs pourrait induire en erreur et faire croire à l'existence des écarts si l'on ne tient pas compte de la marche d'oscillations des valeurs. Il convient également de remarquer que cette marge est relativement importante quand on utilise la chromatographie sur papier et de ce fait l'emploi de cette technique, pour avoir des résultats valables, nécessite un nombre considérable d'expériences. Il apparaît d'autre part que l'analyse directe sans isolement, fournit une valeur de GMP plus faible que les préparations obtenues par la méthode au phénol. Ceci peut s'expliquer par une action RNAsique durant l'extraction qui conduit à un enrichissement de GMP.

Ajoutons que la composition centésimale en moles de ribonucléotides que nous avons trouvée pour le foie (voir tableau 34) est en accord avec les résultats de Davidson (91), Grosbie (153), Kirby (207), Weill (394), mais diffère plus ou moins nettement des compositions d'ARN trouvées pour le foie de rat par Volkin (386), Werkheiser (393), Gold (136), Lamirande (220), Butler (56), Reddy (314), Pileri (302), Sibatani (353), Montreuil (272) et leurs collaborateurs.

2° ETUDE COMPARATIVE DE LA CONSTITUTION DES ARN TOTAUX DU FOIE ET DES TUMEURS.

La comparaison de la répartition globale des ARN du foie et des deux tumeurs étudiées (tableau 35): l'hépatome de Zajdela et l'ascite de Novikoff (cellules malignes de la lignée lymphoïde), révèle une différence significative ($p < 0,01$) quant au GMP qui se trouve à un taux plus élevé dans le foie normal que dans les tumeurs. L'ARN du foie est moins riche en CMP que l'ARN de l'ascite de Novikoff. Mais notons que les deux tumeurs ont une composition d'ARN global très voisine. Les différences notées pourraient être dues à un changement qualitatif d'une seule fraction d'ARN cellulaire, si celle-ci existe à un taux suffisamment important pour influencer la moyenne. Elle pourrait également être le résultat de changements intervenant dans plusieurs fractions subcellulaires. Pour répondre au problème posé, nous avons examiné tout d'abord la répartition des nucléotides dans l'ARN du noyau de l'hépatome de Zajdela et du foie. Il ne nous a pas été possible de poursuivre le travail sur l'ascite de Novikoff vue l'extinction de la souche et l'impossibilité de nous la procurer en Europe. L'expérience de l'électrophorèse sur papier nous a conduit à entreprendre ces essais en procédant à une séparation sur colonne échangeuse d'anions Dowex 1 × 8 et en opérant sur la quantité totale d'ARN sans purification préalable. Les résultats sont exposés ailleurs.

C. — *Effet du jeûne protéique sur le développement de l'hépatome de* ZAJDELA.

A l'opposé de ce qui est le cas des cellules autotrophes qui synthétisent les molécules complexes à partir d'éléments simples, l'équilibre cellulaire dépend chez les animaux supérieurs de l'apport alimentaire. On n'a guère besoin de rappeler que l'on connaît depuis fort longtemps le rôle des acides nucléiques dans la biosynthèse des protéines tissulaires (30 - 40 - 66 - 67); plus récemment divers auteurs ont démontré que l'apport protéique influence la biosynthèse et la répartition des acides nucléiques dans les cellules d'animaux supérieurs. Il a été en particulier démontré dans notre laboratoire [Busch-Salmon (53) et Quirin et collaborateurs (312a)] que la biosynthèse de l'ARN messager et de l'ARN soluble spécifique dépend de l'apport protéique. Or, le développement de l'hépatome s'accompagne de synthèses intenses d'acides nucléiques et de protéines. Aussi avons-nous jugé intéressant d'analyser l'influence d'une carence protéique sur le métabolisme des acides nucléiques de l'hépatome de Zajdela, tumeur à prolifération rapide, et du foie dont le taux global de biosynthèse des protéines et acides nucléiques est beaucoup moins élevé. Ainsi nous avons étudié l'effet de l'apport azoté alimentaire sur la régulation de la biosynthèse de l'ARN des cellules au repos et en prolifération.

1° EFFET DE LA CARENCE PROTEIQUE SUR LE FOIE DE L'ANIMAL ASCITIQUE.

Dans le tableau 36 figurent les valeurs enregistrées au niveau du foie d'animaux porteurs de tumeurs et soumis soit au régime normal soit à une carence protéique. Les valeurs sont exprimées en quantité absolue pour un foie. Il est ainsi plus aisé de déduire les pertes nettes en protéines et acides nucléiques. On peut facilement déduire de nos chiffres les teneurs des divers constituants, qui représentent un quotient de deux variables et se prêtent de ce fait moins bien à la discussion de résultats. Dans le tableau 37 figurent les ASR de l'ARN et de l'ADN rapportés à l'activité spécifique du P inorganique.

Il ressort de la confrontation des valeurs trouvées (tableau 36) que les quantités absolues du poids frais, des protéines, de l'ARN et de l'ADN du foie diminuent régulièrement sous l'action de la carence protéique chez les animaux porteurs de tumeurs. Cette réduction hautement significative ($p < 0{,}01$) atteint en moyenne 29% pour le poids frais, 42% pour les protéines, 31% pour l'ARN et 21% pour l'ADN. Les teneurs en ARN et en ADN par g de protéines des foies de rats jeûneurs sont dans la majorité des cas plus élevées que celles des témoins. Ceci prouve que la perte protéique est généralement plus accusée que celle de l'ARN. Comme par ailleurs on note aussi une

TABLEAU 36

INFLUENCE DU JEUNE PROTEIQUE SUR LES PROTEIDES ET LES ACIDES NUCLEIQUES DU FOIE DE RAT PORTEUR DE LA TUMEUR DE ZAJDELA.

Les chiffres entre parenthèse correspondent à la diminution du poids corporel moyen des animaux en pour cent de leur poids initial, après une durée de jeûne protéique de 4 semaines.

T = témoins J = jeûneurs

N° Exp.	Nbre. de rats	par foie				P ARN / P ADN	variations en pour 100 J/T par foie				P ARN / P ADN	par g protéides	
		Poids frais en g	g protéides	mg P ARN	mg P ADN		Poids frais	Protéides	P ARN	P ADN		P ARN	P ADN
7	6T 6J (24)	9,75 5,52	1,58 0,94	6,36 3,81	1,52 1,24	4,18 3,07	-43	-41	-40	-18	-26	+ 1	+37
8	7T 7J (32)	9,17 5,08	1,49 0,84	3,86 2,34	1,42 0,98	2,71 2,40	-45	-43	-38	-31	-11	+ 8	+22
9	4T 4J (31)	7,77 5,98	1,47 0,88	6,85 5,17	1,75 1,19	3,90 4,36	-23	-40	-24	-32	+12	+26	+13
10	8T 9J (26)	8,23 7,56	1,70 0,97	7,42 5,60	1,52 1,33	4,87 4,26	- 8	-43	-24	-13	-13	+33	+52
11	4T 4J (25)	9,83 7,44	1,98 1,14	9,88 7,14	1,68 1,50	5,87 4,76	-24	-42	-28	-11	-19	+26	+55

TABLEAU 37

INFLUENCE DU JEUNE PROTEIQUE SUR L'INCORPORATION DU $^{32}PO_4'''$ DANS LES ACIDES NUCLEIQUES DU FOIE DE RAT PORTEUR DE LA TUMEUR DE ZAJDELA.

N° Exp.	Nombre de rats	AS PO_4'''	ASR ARN	ASR ADN	Variations en pour 100 J/T		
					AS PO_4'''	ASR ARN	ASR ADN
7	6T 6J	251 248	0,400 0,492	0,152 0,108	- 1	+ 23	- 29
8	7T 7J	442 400	0,119 0,201	0,027 0,017	- 9	+ 69	- 37
9	4T 4J	282 278	0,360 0,492	0,065 0,025	- 1	+ 37	- 62
10	8T 9J	252 278	0,403 0,589	0,051 0,032	- 1	+ 46	- 37
11	4T 4J	252 259	0,339 0,529	0,072 0,036	+ 3	+ 56	- 50

T = témoins J = jeûneurs

réduction de l'ADN il y a lieu d'admettre la disparition de cellules entières. Le rapport ARN/ADN accuse dans quatre expériences sur cinq une baisse plus ou moins accusée ($p > 0,05$).

L'étude de l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ (tableau 37) révèle que l'ASR ARN s'accroît d'une façon nette ($p < 0,01$) dans tous les essais de foies de rats jeûneurs porteurs de l'ascite. Cette augmentation est en moyenne 46% pour l'ASR ARN. L'ASR ADN diminue sous l'effet du jeûne protéique ($p < 0,01$). La valeur moyenne de cette réduction est de 43%.

Si la baisse de l'ARN du foie d'animaux porteurs de tumeurs est semblable à celle observée par divers auteurs chez des sujets normaux (58 - 188 - 189 - 246 - 247 - 277 - 374 - 379 - 394), il n'en est pas de même en ce qui concerne l'ADN qui diminue chez les animaux cancéreux alors qu'il demeure constant chez les sujets indemnes (189 - 246 - 247). Deux hypothèses sont à envisager pour l'explication de ce phénomène. La première serait, que la présence de la tumeur, qui prélève des protéines dans tous les tissus en vue de ses néosynthèses, constitue un facteur aggravant les effets du jeûne protéique et fait disparaître des cellules hépatiques entières avec leur noyau et non seulement leurs protéines cellulaires, comme c'est le cas chez des animaux sans cancer. Une autre explication est suggérée par les différences observées au niveau du foie à la suite de la présence de la tumeur: nous avons signalé que dans ce cas on observe une stimulation de la biosynthèse d'ARN et d'ADN hépatiques. Comme dans nos essais la comparaison concerne des animaux porteurs de tumeurs aussi bien au régime normal qu'au régime carencé, on peut imaginer que la différence observée quant à l'ADN représente seulement une inhibition de sa biosynthèse ou de son renouvellement normalement stimulé par la tumeur à la suite de la carence protéique. En effet les taux de réduction d'ADN observés sont assez voisins de la différence constatée entre le foie d'animaux cancéreux et le foie d'animaux indemnes pour un certain nombre d'expériences. Toutefois pour deux lots d'animaux la baisse est nettement plus accusée, ce qui permet d'invoquer la première hypothèse. Les valeurs plus faibles du rapport ARN/ADN chez les animaux porteurs de tumeurs, indiquent qu'en tout état de cause la biosynthèse d'ARN est plus affectée que celle de l'ADN. Les résultats concernant l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ font également pencher vers cette explication. En effet la réduction de l'AS ADN s'inscrit contre l'hypothèse de la diminution du quotient ARN/ADN, elle ne pourrait être due qu'à un accroissement du dénominateur. Pour ce qui est du métabolisme de l'ADN du foie d'animaux porteurs de tumeurs sous l'effet d'une carence protéique, aucune donnée bibliographique nous est connue.

Notons encore que l'accroissement de l'AS de l'ARN du foie d'animaux soumis au jeûne protéique chez des animaux cancéreux est semblable à ce que l'on observe chez les sujets indemnes dans les mêmes conditions de nutrition (189 - 246 - 247 - 277 - 394). Le fait

que CANTEROW et collaborateurs (60) n'ont pas constaté de changement dans l'incorporation d'uracile 2-C14 dans le foie d'animaux porteurs d'hépatome, sous l'effet d'un jeûne total de courte durée, provient des conditions expérimentales différentes des nôtres et du fait que l'incorporation d'uracile -2-C14 est généralement très faible en dehors de proliférations cellulaires très intenses. L'augmentation d'AS ARN peut s'expliquer par l'hétérogénéité des ARN tissulaires et par la présence de la fraction à renouvellement lent et d'autres à renouvellement plus rapide. On peut admettre que la disparition de l'ARN à renouvellement lent laissant l'ARN à renouvellement rapide fait apparaître une incorporation plus importante de $^{32}PO_4'''$ chez les animaux carencés. L'existence d'une fraction d'ARN à turnover rapide présente en permanence dans la cellule et y jouant un rôle essentiel est en bon accord avec les conceptions actuelles concernant les divers types d'ARN cellulaires. La diminution de l'ARN du foie serait dûe à la disparition d'une fraction de l'ARN ribosomal à turnover plus lent conformément aux données apportées par BUSCH-SALMON (53). Il est à peine nécessaire d'insister sur l'intérêt de l'observation que nous venons de rapporter, en pathologie humaine. On sait en effet que l'atteinte tumorale s'accompagne d'inappétance et de carence alimentaire, elle est donc susceptible de provoquer des pertes cellulaires dans un organe essentiel comme le foie, semblables à celles que nous avons notées.

2° EFFET DE LA CARENCE PROTEIQUE SUR LE DEVELOPPEMENT DE L'ASCITE DE ZAJDELA.

En ce qui concerne la tumeur, l'effet du jeûne protéique sur le développement de l'ascite de Zajdela révèle que la tumeur se développe en dépit du fait que l'organisme hôte soit complètement privé de protéides exogènes. Le tableau 38 tient compte de nos résultats. Là nous indiquons également les quantités absolues qui offrent un meilleur indice de la néosynthèse. Pour les différents lots d'animaux en expérience comportant le nombre de rats que nous indiquons, les valeurs des quantités d'ARN et d'ADN synthétisées par des animaux groupés par ~~une même~~ portée et ayant reçu le même inoculum sont très voisines. La perte de poids corporel est parallèle au développement de la tumeur. Il existe sans doute une compétition entre l'hôte et la tumeur pour l'utilisation de composés essentiels en vue de la synthèse de constituants cellulaires. Cependant la tumeur se développe moins abondamment sous l'effet de la carence protéique comme en témoigne la réduction de la quantité absolue des protéides, de l'ARN et de l'ADN (tableau 38). Elles diminuent d'une façon systématique et significative ($p < 0,01$) en moyenne de 43%, 44% et 36% respectivement sous l'effet du jeûne protéique. Notons cependant que la néosynthèse d'ADN est dans tous les essais moins affectée que celle de l'ARN. Etant donné l'importance de l'inoculum, il convient de grouper les témoins et les jeûneurs ayant reçu la même suspension d'ascite

TABLEAU 38

INFLUENCE DU JEUNE PROTEIQUE SUR LES ACIDES NUCLEIQUES DE L'HEPATOME DE ZAJDELA.

Les chiffres entre parenthèse correspondent à la diminution corporelle moyenne des animaux jeûneurs en pour cent de leur poids initial, après une durée de jeûne protéique de 4 semaines.

T = témoins J = jeûneurs

N° Exp.	Nombre de rats	par ascite			P ARN / P ADN	variations en pour 100 J/T par ascite			par g de protéides		P ARN / P ADN
		mg de protéides	mg de P ARN	mg de P ADN		Protéides	ARN	ADN	P ARN	P ADN	
1	9T 9J (25)	470 283	3,74 2,43	2,08 1,49	1,80 1,62	- 40	- 35	- 28	+ 7	+ 19	- 10
2	6T 7J (16)	413 241	2,62 1,35	2,88 2,01	0,91 0,67	- 42	- 49	- 30	- 12	+ 20	- 26
3	10T 9J (23)	360 191	242 141	157 102	1,54 1,34	- 47	- 42	- 35	+ 10	+ 23	- 11
4	3T 3J (34)	384 276	169 104	194 136	0,87 0,77	- 28	- 38	- 30	- 14	- 3	- 12
5	5T 5J (30)	359 129	318 121	161 67	1,97 1,83	- 65	- 62	- 59	+ 9	+ 18	- 7
6	4T 4J (25)	628 416	574 367	283 186	2,03 1,98	- 34	- 36	- 34	- 3	- 1	- 2

TABLEAU 39

INFLUENCE DU JEUNE PROTEIQUE SUR L'INCORPORATION DE $^{32}PO_4'''$ DANS LES ACIDES NUCLEIQUES DE L'HEPATOME DE ZAJDELA.

T = témoins J = jeûneurs

N° Exp.	Nombre de rats	AS PO_4'''	ASR ARN	ASR ADN	variations en pour 100 J/T AS PO_4'''	ASR ARN	ASR ADN
1	9T 9J	341 273	0,645 0,777	0,642 0,708	- 20	+ 20	+ 10
2	6T 7J	614 713	0,461 0,645	0,328 0,356	+ 19	+ 40	+ 8
3	10T 9J	694 831	0,456 0,600	0,325 0,444	+ 20	+ 28	+ 36
4	3T 5J	207 373	0,189 0,198	0,113 0,122	+ 80	+ 5	+ 8
5	4T 4J	386 288	0,922 1,070	0,850 0,948	- 25	+ 16	+ 11

et il y a lieu d'analyser les résultats tenant compte de ce fait. Nous avons évalué le rapport des valeurs jeûneurs/témoins et évalué le test de Fisher (113) pour voir s'il y a une différence significative entre les quotients jeûneurs/témoins et l'unité (valeur du rapport lorsqu'il n'y a pas de variation chez les animaux traités par rapport aux témoins). L'examen des teneurs en ARN par g de protéides révèle qu'il n'y a pas de variation significative ($p \gg 0,05$) sous l'effet d'une carence protéique; ce qui indique que l'inhibition de la néosynthèse de protéides et de l'ARN est du même ordre de grandeur. Par contre le rapport ADN/protéides augmente en moyenne de 13% ($p < 0,05$) par conséquent la synthèse des protéides diminue plus vite que l'ADN. Le rapport P ARN/P ADN tend à diminuer de 11% en moyenne.

Le maintien de la croissance de diverses tumeurs a été observé à la suite de carence protéique de courte durée ou si le régime alimentaire n'apporte qu'une quantité diminuée de protéines par rapport à la nourriture normale (11 - 12 - 81 - 96 - 102 - 141 - 142 - 226 - 399). Mais dans aucun cas l'épuisement des réserves azotées a été poussé aussi loin que dans nos essais. Or, il ressort de nos expériences que malgré une perte considérable de protéines antérieures à la greffe de la tumeur celle-ci se développe. Le ralentissement de la croissance n'a jamais été apprécié d'une façon quantitative, pas plus que la distinction n'a été faite entre le taux de réduction d'ARN et d'ADN. Ainsi on peut se ranger à la représentation imagée de MIDER (263) selon lequel le néoplasme constitue un «piège à azote» pour les protéines de l'animal hôte. D'ailleurs l'influence des protéines exogènes sur la génèse et la croissance des cancers a depuis longtemps retenu l'attention des nutritionnistes. Ainsi les travaux de SILVERSTONE (357) et TANNENBAUM (376) ont montré que les régimes riches en protéides (allant jusqu'à 45% de l'alimentation totale) n'augmentent pas l'incidence des cancers hépatiques, par contre un régime appauvri en caséine (9% de l'alimentation totale) provoquerait une forte inhibition de la formation d'hépatomes. Lors de l'influence des protéines alimentaires sur la carcinogénèse, ce n'est pas seulement la quantité protéique qui importe mais aussi la qualité nutritionnelle des protéines: WHITE et collaborateurs (400) ont constaté qu'une diète déficiente en cystine inhibe significativement la production de leucémie chez la souris.

L'analyse de l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ (tableau 39) révèle un accroissement de l'ASR ARN de 21% et de l'ASR ADN de 15%. Toutefois, si dans le cas de l'ARN la variation est significative ($p = 0,05$) il n'en est pas de même pour l'ADN ($p > 0,05$). Comme pour le foie il y a lieu de trouver une explication au renouvellement accru de l'ARN et au maintien de celui de l'ADN alors que les quantités absolues de ces composés synthétisés chez les animaux carencés en protéines sont plus faibles. Comme dans le cas du foie l'incorporation plus rapide du $^{32}PO_4'''$ dans l'ARN peut s'expliquer de deux façons, soit qu'un manque de protéines pour fixer l'ARN cellulaire favorise la dégradation

d'ARN et qui par un phénomène de rétrocontrôle stimule la synthèse de l'ARN, soit que l'accroissement de l'incorporation se manifeste à cause de l'absence d'une certaine fraction d'ARN à renouvellement lent qui ramène l'AS ARN, dans une tumeur en évolution, au cours d'un régime normal, à un niveau plus bas. Nos résultats sont en accord avec la constatation de CANTEROW (60) qui note une augmentation d'incorporation d'uracile-2-C14 dans l'ARN d'hépatome de rat au cours d'un jeûne total. Les différences entre nos résultats et ceux de MUNRO et CLARK (278 - 279) qui n'observent pas de changement dans l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans l'ARN est sans doute en rapport avec la durée plus courte de jeûne protéique et le sacrifice plus précoce des animaux, 3 heures après l'injection de l'isotope marqué, délai auquel l'ARN cytoplasmique commence à peine à se marquer.

D. — *Effet de la présence de la tumeur sur les acides nucléiques de quelques tissus de l'organisme hôte.*

L'amaigrissement de l'organisme de l'animal porteur de tumeur et la mobilisation des protéines et des lipides (264) de l'hôte au bénéfice de la tumeur sont des faits couramment admis. L'autonomie, caractère souvent invoqué de la cellule cancéreuse est une notion relative, car il est bien établi qu'il y a des relations entre la tumeur et l'animal porteur d'un cancer. Ainsi GREENSTEIN (146) a pu écrire que «les relations entre hôte et tumeur sont la clé du problème du cancer».

Dans l'hypothèse que la croissance de tumeurs est conditionnée par un facteur, qu'il s'agisse d'un composé chimique ou d'un agent viral stimulant la prolifération cellulaire, nous avons analysé l'influence éventuelle de la présence de la tumeur de Zajdela sur le métabolisme des acides nucléiques de quelques tissus de rats porteurs de la tumeur: le foie, le pancréas, le rein et les surrénales.

1° EFFET DE LA PRESENCE DE L'HEPATOME ASCITIQUE SUR LE FOIE.

L'étude comparée du foie d'animaux sains «foie témoin» et du foie d'animaux porteurs de l'hépatome ascitique, «foie ascitique», a conduit aux résultats consignés dans les tableaux 40 et 41. L'examen du tableau 40 révèle une augmentation pondérale du foie de 23% environ ($p < 0,02$) parallèlement à une légère majoration de protéines qui pourrait être dûe à des phénomènes congestifs causés par la présence de la tumeur. La comparaison des quantités absolues d'acides

TABLEAU 40

INFLUENCE D'UN HEPATOME ASCITIQUE SUR LES ACIDES NUCLEIQUES DU FOIE

FT: foie de l'animal témoin
FA: foie de l'animal porteur de l'hépatome ascitique.

N° Exp.	Nbre rats		par foie				$\frac{ARN}{ADN}$
			poids frais en g	protéines en g	P ARN en mg	P ADN en mg	
1	2	FT	6,21	1,29	4,20	1,52	2,76
	2	FA	6,85	1,24	5,64	1,71	3,30
			+ 10%	- 4%	+ 34%	+ 12%	+ 19%
2	2	FT	6,12	1,31	4,00	1,38	2,90
	2	FA	7,61	1,42	5,50	1,68	3,28
			+ 24%	+ 8%	+ 37%	+ 22%	+ 13%
3	4	FT	6,23	1,35	4,31	1,45	2,97
	5	FA	7,67	1,46	6,56	1,56	4,20
			+ 23%	+ 8%	+ 52%	+ 7%	+ 41%
4	4	FT	6,02	1,25	4,89	1,42	3,43
	5	FA	8,20	1,50	7,48	1,69	4,42
			+ 36%	+ 20%	+ 53%	+ 19%	+ 29%
5	4	FT	6,27	1,31	4,66	1,44	3,24
	4	FA	7,75	1,47	6,67	1,62	4,12
			+ 24%	+ 12%	+ 43%	+ 12%	+ 27%

TABLEAU 41

INFLUENCE D'UN HEPATOME ASCITIQUE SUR LES ACIDES NUCLEIQUES DU FOIE

FT: foie de l'animal témoin
FA: foie de l'animal porteur de l'hépatome ascitique.

N° Exp.	Nombre rats		mg de P pour 100g de foie		mg de P par g de protéines	
			ARN	ADN	ARN	ADN
1	2	FT	67,5	24,4	3,26	1,18
	2	FA	82,3	25,0	4,55	1,38
			+ 22%	+ 2%	+ 40%	+ 17%
2	2	FT	65,4	22,6	3,05	1,05
	2	FA	72,3	22,1	3,88	1,18
			+ 11%	- 2%	+ 27%	+ 12%
3	4	FT	69,2	23,3	3,19	1,07
	5	FA	85,6	20,4	4,48	1,07
			+ 24%	- 12%	+ 40%	0%
4	4	FT	81,1	23,6	3,91	1,14
	5	FA	91,1	20,7	4,99	1,13
			+ 12%	- 12%	+ 28%	- 1%
5	4	FT	74,4	23,0	3,56	1,10
	4	FA	86,0	20,9	4,54	1,10
			+ 16%	- 9%	+ 27%	0%

TABLEAU 42

INFLUENCE D'UN HEPATOME ASCITIQUE SUR L'INCORPORATION DE $^{32}PO_4'''$ DANS LES ACIDES NUCLEIQUES DU FOIE

FT: foie de l'animal témoin
FA: foie de l'animal porteur de l'hépatome ascitique.

N° Exp.	Nombre rats		AS ARN	AS ADN	AS PO4'''	Radioactivité totale de l'ARN par foie AS PO4'''
1	2	FT	96	1,5	220	1830
	2	FA	147	8	320	2590
			+ 53%	+433%	+ 45%	+ 42%
2	2	FT	81	7,7	303	1070
	2	FA	127	20,5	330	2110
			+ 57%	+166%	+ 9%	+ 97%
3	4	FT	112	7,2	537	900
	5	FA	152	35,5	578	1720
			+ 36%	+394%	+ 8%	+ 91%
4	4	FT	204	45	439	2270
	5	FA	227	105	551	3080
			+ 11%	+133%	+ 25%	+ 36%
5	4	FT	254	18	591	2010
	4	FA	235	38	581	2680
			- 7%	+111%	- 1%	+ 34%

TABLEAU 43

INFLUENCE D'UN HEPATOME ASCITIQUE SUR LES ACIDES NUCLEIQUES DU PANCREAS.

PT: pancréas d'animaux témoins
PA: pancréas d'animaux porteurs d'ascite de Zajdela.

N° Exp.	Nbre Rats		protéines en mg par pancréas	mg de P pour 100g de pancéas		mg de P par pancréas		mg de P par g de protéines		ARN / ADN
				ARN	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	
1	2	PT	190	125	29,2	1,41	0,33	7,42	1,73	4,28
	2	PA	198	149	44,3	1,62	0,48	8,18	2,43	3,36
			+ 4%	+19%	+52%	+15%	+45%	+10%	+40%	-11%
2	4	PT	178	123	26,4	1,42	0,31	8,00	1,72	4,66
	5	PA	180	86,3	27,6	1,41	0,45	7,86	2,52	3,13
			+ 1%	+30%	+ 4%	- 1%	+45%	- 2%	+46%	-33%
3	4	PT	168	161	28,9	1,61	0,29	9,58	1,72	5,58
	5	PA	166	125	26,0	1,60	0,33	9,64	2,00	4,81
			- 1%	-22%	-10%	- 1%	+14%	+ 1%	+16%	-14%
4	7	PT	148	142	35,6	1,18	0,30	7,97	2,00	3,98
	8	PA	158	101	27,9	1,28	0,35	8,10	2,24	3,62
			+ 7%	-29%	-22%	+ 8%	+17%	+ 2%	+12%	- 9%
5	6	PT	141	134	31,8	1,18	0,28	8,38	1,99	4,2
	6	PA	150	102	26,8	1,36	0,36	9,06	2,38	3,81
			+ 6%	-24%	-16%	+15%	+27%	+ 8%	+19%	- 9%

nucléiques met en évidence un accroissement notable de l'ordre de 43% en moyenne ($p < 0,01$) pour l'ARN et une majoration moins frappante de 14% en moyenne ($p < 0,05$) pour l'ADN. Il apparaît (tableau 41) que le taux d'ARN hépatique chez des animaux cancéreux augmente en moyenne de 17% d'une façon significative ($p < 0,01$). Il n'en est pas de même en ce qui concerne l'ADN dont les valeurs apparaissent plus faibles de 7% environ que dans les foies d'animaux témoins. Il semble donc ne pas y avoir de parallélisme entre l'augmentation pondérale du foie et celle de l'ADN. On retrouve le même phénomène quand on rapporte les valeurs des deux types d'acides nucléiques aux protéines: le quotient d'ARN/protéines s'élève de 32% en moyenne ($p < 0,01$) tandis que le rapport ADN/protéines ne montre que des oscillations non significatives ($p > 0,05$).

L'étude de l'incorporation de $^{32}PO_4'''$ dans les acides nucléiques nous fournit un aspect complémentaire de leur évolution sous l'effet de la présence de l'hépatome (tableau 42).

Compte tenu de l'AS du précurseur, le *P* minéral, la radioactivité incorporée n'est pas identique dans les acides nucléiques du foie d'animaux sains et ceux d'animaux cancéreux pour une même quantité de $^{32}PO_4'''$ injectée: il y a croissance notable ($p < 0,05$) de 60% en moyenne de la quantité absolue de $^{32}PO_4'''$ dans l'ARN de foie de rat ascitique. L'AS ADN du foie d'animaux hébergeant une tumeur est également régulièrement supérieure ($p < 0,05$) à celle du foie témoin.

En fait, la radioactivité de l'ADN du foie chez les animaux témoins est très faible; l'existence d'un métabolisme plus intense de l'ADN chez des animaux atteints de tumeurs fait apparaître d'emblée un pourcentage d'accroissement considérable.

On pouvait aussi penser que le foie d'animaux porteurs de l'hépatome de Zajdela pouvait présenter des métastases qui seraient à l'origine du changement observé dans le métabolisme des acides nucléiques du foie. Mais les examens histologiques ne nous ont pas révélé de modifications dans les foies étudiés; ce qui n'est pas le cas dans les travaux histologiques de Begg (20), Kellsall (200), Maver (261) qui ont montré l'existence de l'hématopoïèse extramédullaire, ou même d'infiltrations lymphocytaires ou plasmocytaires dans le foie d'animaux porteurs de différentes tumeurs qui pourraient être cause de modifications dans le métabolisme des acides nucléiques. Nous sommes donc bien en présence d'une influence indéniable de la tumeur sur le foie et son métabolisme des acides nucléiques.

Yeakel (407) et Babson (12) ont déjà signalé l'accroissement pondéral du foie chez des animaux porteurs de différentes tumeurs. Pour ce dernier auteur, le foie qui occupe une position clé dans les différents métabolismes est sensible à divers stimuli, dont la croissance maligne, et réagit pour faire face à un métabolisme accru imposé par le développement de la tumeur. Mc Even (238) constate

l'augmentation d'azote protéique; ce qui indique bien un accroissement de substances du foie et non seulement de la teneur en eau. Annau (10) et Hemingway (162) ont signalé une augmentation de l'activité mitotique dans le foie d'animaux hébergeant une tumeur. De nombreux travaux ont mis en évidence des variations dans le métabolisme des acides nucléiques du foie d'animaux porteurs de différents néoplasmes: Cerecedo (68 - 69 - 70 - 71 - 72 - 233 - 313), Kelly (198 - 199 - 297), Canterow (61) et leurs collaborateurs trouvent une augmentation du renouvellement des acides nucléiques hépatiques chez les animaux porteurs des sarcomes de Jensen, du lymphosarcome de Murphy, de la tumeur de Walker, du carcinome mammaire. Khouvine, dans ses travaux (203 - 204 - 276) signale aussi une augmentation de l'AS de l'ADN dans un hépatome, un accroissement de l'AS ARN dans l'épithélioma atypique de Guérin chez le rat. Way (392), Balis (13) observent des faits analogues sur différents rongeurs. De même Payne (296) et Tyner (383), Anderson (8), Furlong (124) constatent dans le foie d'animaux cancéreux une stimulation du renouvellement des acides nucléiques en utilisant du formiate-C-14, de la glycine-2-C-14 et de l'adénine-8-C-14.

2° EFFET DE LA PRESENCE DE L'HEPATOME ASCITIQUE SUR LES ACIDES NUCLEIQUES DU PANCREAS.

Le tableau 43 indique que la quantité absolue de protéines et de l'ARN du pancréas ne subissent pas de variations systématiques ($p > 0,05$) chez l'hôte porteur de la tumeur. Par contre dans toutes les expériences, la quantité d'ADN par pancréas est augmentée ($p < 0,01$). Les teneurs de P ARN et de P ADN rapportées au poids frais présentent des oscillations hétérogènes ($p > 0,1$), ce qui s'explique par la difficulté de la détermination exacte du poids frais vu que le pancréas, organe diffus, est plus ou moins surchargé de tissu adipeux. Les valeurs de P ARN par g de protéines restent inchangées ($p > 0,6$) en présence de la tumeur, mais celles du P ADN rapportées à la même base de référence révèlent régulièrement ($p < 0,01$) une augmentation (de 27% de la moyenne) dans le pancréas de rats porteurs de l'hépatome. Le rapport ARN/ADN accuse, de ce fait, une diminution significative ($p < 0,01$).

Le tableau 44 fait état de nos résultats sur l'incorporation du $^{32}PO_4'''$ dans les acides nucléiques du pancréas. Les AS PO_4''' des pancréas d'animaux présentant une ascite sont toutes supérieures ($p < 0,01$) à celles des pancréas normaux correspondants. Si on compare les ASR de l'ARN et de l'ADN, on trouve respectivement un accroissement moyen de 33% ($p < 0,01$) et de 226% ($p < 0,01$). Les radioactivités totales relatives à l'AS du PO_4''' acido-solubles mettent encore mieux en relief le renouvellement intense ($p < 0,01$): pour l'ARN, nous avons en moyenne une augmentation de 43% et pour l'ADN un accroissement moyen de 330%.

TABLEAU 44

INFLUENCE D'UN HEPATOME ASCITIQUE SUR L'INCORPORATION DE $^{32}PO_4'''$ DANS LES ACIDES NUCLEIQUES DU PANCREAS.

PT: pancréas d'animaux témoins
PA: pancréas d'animaux porteurs d'ascite de Zajdela.

N° Exp.	Nbre Rats		AS PO_4'''	ASR ARN	ASR ADN	Par pancréas	
						Radioactivité ARN / AS PO_4'''	Radioactivité ADN / AS PO_4'''
1	2	PT	162	0,143	0,051	202	16,9
	2	PA	225	0,207	0,231	335	111
			+39%	+45%	+351%	+66%	+557%
2	4	PT	178	0,137	0,073	195	22,3
	5	PA	234	0,177	0,162	250	73,4
			+31%	+29%	+122%	+28%	+229%
3	4	PT	158	0,096	0,051	154	14,7
	5	PA	209	0,137	0,113	219	37,6
			+32%	+43%	+122%	+42%	+156%
4	7	PT	673	0,094	0,043	111	12,7
	8	PA	709	0,123	0,166	157	58,8
			+ 5%	+31%	+286%	+41%	+363%
5	6	PT	334	0,135	0,060	159	16,8
	6	PA	409	0,159	0,210	216	75,0
			+22%	+18%	+250%	+36%	+347%

TABLEAU 45

INFLUENCE DE L'HEPATOME ASCITIQUE SUR LES ACIDES NUCLEIQUES DU REIN.

RT: Reins d'animaux témoins
RA: Reins d'animaux porteurs de l'hépatome de Zajdela.

N° Exp.	Nbre de rats		µg de P par rein		mg de P par 100g de rein		mg de P par g de protéines		ARN / ADN
			ARN	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	
1	2	RT	199	192	29,7	28,7	2,03	1,96	1,04
	2	RA	248	187	36,8	27,7	2,67	2,01	1,32
			+25%	- 2%	+24%	- 3%	+31%	+ 3%	+27%
2	2	RT	143	210	20,2	29,6	1,49	2,19	0,68
	2	RA	154	216	21,9	30,7	1,59	2,22	0,71
			+ 8%	+ 3%	+ 8%	+ 4%	+ 7%	+ 1%	+ 4%
3	2	RT	247	198	30,1	24,1	2,24	1,80	1,25
	2	RA	242	198	28,7	23,5	2,16	1,77	1,22
			- 2%	0%	- 5%	- 2%	- 4%	+ 2%	- 2%
4	2	RT	176	138	27,4	21,6	1,89	1,48	1,27
	2	RA	179	155	25,0	21,6	1,86	1,61	1,15
			+ 2%	+12%	- 9%	0%	- 2%	+ 8%	- 9%
5	4	RT	162	170	23,4	24,6	1,64	1,72	0,95
	6	RA	191	163	25,5	21,8	1,99	1,70	1,17
			+18%	- 4%	+ 9%	-11%	+21%	- 1%	+23%

TABLEAU 46

INFLUENCE DE L'HEPATOME ASCITIQUE SUR LE REIN

RT: Reins d'animaux témoins
RA: Reins d'animaux porteurs de tumeur ascitique.

N° Exp.	Nbre Rats		par rein		
			Poids frais en mg	protéines en mg	P32 incorporé dans l'ARN / AS PO4'''
1	2	RT	670	98	90
	2	RA	674	93	86,6
			0%	- 5%	- 4%
2	2	RT	709	96	49,5
	2	RA	704	97	56
			- 1%	+ 1%	+ 13%
3	2	RT	820	110	82,2
	2	RA	842	112	85
			+ 3%	+ 2%	+ 3%
4	2	RT	643	93,1	102
	2	RA	717	96,4	92
			+ 12%	+ 3%	- 10%
5	4	RT	691	98,9	68,3
	6	RA	749	96,0	65,2
			+ 8%	- 3%	- 4%

TABLEAU 47

INFLUENCE DE L'HEPATOME ASCITIQUE SUR L'ACIDE RIBONUCLEIQUE DES SURRENALES

N° Exp.	Nbre rats		pour 2 surrénles			AS ARN	Radioactivité totale de l'ARN des deux surrénales / AS PO4
			poids frais en mg	de mg de P ARN	Radioactivité totale de l'ARN		
1	4	ST	60	17,5	1382	79	10,5
	4	SA	74	25,5	2630	103	13,8
			+23%	+46%	+90%	+30%	+31%
2	6	ST	60	23,4	5030	215	16,3
	6	SA	76	25,1	6850	273	23,8
			+27%	+ 7%	+36%	+27%	+46%
3	4	ST	53	27,7	3630	131	15,3
	5	SA	78	31,7	6090	192	18,4
			+47%	+14%	+68%	+46%	+20%
4	6	ST	56	19,6	3430	175	16,4
	7	SA	81	26,3	4500	171	18,8
			+45%	+34%	+31%	- 2%	+15%

ST = Surrenales d'animaux témoins
SA = Surrénales d'animaux porteur de l'hépatome de Zajdela

L'étude dynamique permet en plus de déceler une augmentation du métabolisme de l'ARN dont les quantités absolues sont restées inchangées. Ce fait s'explique par une activation métabolique au cours de laquelle la néosynthèse et la dégradation augmentent en même proportion, laissant la quantité tissulaire inchangée.

L'ensemble de nos résultats indique une néosynthèse d'acides nucléiques due à l'effet tumeur-hôte. Ils confirment la labilité des acides nucléiques du tissu pancréatique constatée antérieurement par MANDEL (248). Les travaux de BEGG (20) et FREDERICK (118) font état de la répercussion de la présence de la tumeur sur le métabolisme glucidique du pancréas. Notons que la littérature ne révèle pas beaucoup de données concernant l'influence de la présence d'une croissance maligne sur le pancréas.

3° EFFET DE LA PRESENCE DE L'HEPATOME ASCITIQUE SUR LE REIN.

Nos résultats (tableaux 45 et 46) sur l'influence de la présence de l'hépatome sur les reins ne montrent pas d'effet net sur le poids, les protéines, l'ADN et le quotient $\frac{^{32}PO_4''' \text{ incorporé dans l'ARN}}{AS\ PO_4'''}$. Les variations de l'ARN ne sont pas significatives ($p > 0{,}05$) quelque soit le mode d'expression des résultats: quantité absolue, teneur en g de protéines ou par 100 g de tissus frais.

A l'opposé de ce que l'on constate pour le foie et le pancréas, on ne trouve pas, au niveau du rein, des signes d'activation du métabolisme d'ARN, sous l'effet de la présence d'une croissance maligne. Les valeurs de l'AS de l'ADN n'ont pas été rapportées; elles sont extrêmement faibles aussi bien dans le rein témoin que dans le rein d'animaux porteurs de tumeurs.

4° EFFET DE LA PRESENCE DE L'HEPATOME ASCITIQUE SUR LES SURRENALES.

L'étude comparée des surrénales d'animaux présentant une ascite en évolution et de surrénales d'animaux témoins a conduit aux résultats inscrits dans le tableau 47. Il ressort de ces données que le poids frais, la quantité totale de radioactivité incorporée dans l'ARN ainsi que le quotient $\frac{\text{radioactivité totale de l'ARN}}{AS\ PO_4'''}$ subissent une augmentation significative ($p < 0{,}05$) de 35%, de 56% et de 28% respectivement en moyenne. La quantité globale d'ARN pour deux surrénales s'accroît en moyenne de 25%. Les valeurs concernant l'ADN n'ont pas été déterminées, vu les quantités faibles de matériel sur lesquelles nous avons opéré et la nécessité de purification de l'ADN, avant une détermination correcte de l'AS de cet acide nucléique.

Rappelons que Ball (14), Clark (81), Sure (372), Begg (18 - 19), Mc Even (237) ont également observé un agrandissement de la taille des surrénales chez des rongeurs porteurs de tumeurs; seul ce dernier auteur a signalé une infiltration myeloïde concomittante. Les résultats observés en ce qui concerne l'effet de la présence de la tumeur sur les glandes surrénaliennes de l'hôte peuvent encore avoir une explication différente, vu que ces glandes endocrines sont soumises au syndrome d'agression. On sait, en effet, depuis les travaux de Mandel (249), Davidson (93), Symington (373), Allara (4) et Nicholls (287) que le phénomène du «stress» agit sur l'ARN des surrénales.

5° CONCLUSION.

Nous ne saurions passer sous silence que nos résultats concernant l'effet de la tumeur sur l'hôte ont l'avantage, sur les travaux déjà cités, de donner simultanément le point de vue quantitatif et statique et le point de vue dynamique du métabolisme des acides nucléiques.

Il découle de l'ensemble des données apportées, quant à l'effet de la présence de l'hépatome sur le métabolisme des acides nucléiques de quelques organes de l'hôte, que l'on peut distinguer deux types d'organes: d'une part, ceux qui sont sensibles à l'effet de la présence de la tumeur tel le foie ou le pancréas, d'autre part ceux qui y sont insensibles tel le rein. Notons que les organes sensibles sont précisément ceux qui remplissent les plus importantes fonctions métaboliques de l'organisme. Nous penchons à croire que les néosynthèses déclenchées dans les organes sensibles à l'action à distance de la tumeur, seraient dues à un facteur ou à un principe issu de la tumeur qui serait diffusible et qui activerait le métabolisme des organes de l'hôte. Par ailleurs, la donnée anatomique que le rein est séparé des autres organes abdominaux et de la tumeur par un repli du péritoine rendrait la diffusion d'un tel principe moins facile. Mais l'éventualité d'une action d'un principe issu de l'hépatome sur les glandes surrénales n'est cependant pas à exclure, bien qu'il puisse aussi s'agir d'un syndrome d'aggression.

Khouvine (203) suggère l'existence d'un facteur d'origine tumorale qui agirait sur le foie de l'hôte pour expliquer la relation tumeur-hôte. D'après Furlong (124 - 125), ce principe actif serait une substance thermolabile qui favoriserait l'incorporation de l'adénine dans les acides nucléiques. De nombreux travaux ont déjà été entrepris pour l'étude ou l'isolement d'une telle substance: ainsi Malmgren (243) put augmenter le nombre de mitoses dans le foie, en injectant soit un broyat de tumeur, soit un extrait acellulaire d'origine cancéreuse. Inoue (185) signale une augmentation d'ADN dans le foie de rat sous l'effet d'un broyat de tumeur d'origine humaine. Plus récemment, Hradec (181) constate une augmentation d'incorporation d'acides

aminés marqués dans les tumeurs en présence d'extrait tissulaire lyophilisé d'animaux porteurs de tumeurs. Ce sont les travaux de l'école japonaise de NAKAHARA et de FUKUOKA (280 - 281 - 282 - 283 - 284) qui ont beaucoup contribué à l'étude des relations entre tumeur et l'hôte avec la «toxohormone» qui semble être présente dans toutes les tumeurs (258). Leurs travaux ont été confirmés par ceux de GREENFIELD et MEISTER (143 - 144) de l'école de GREENSTEIN (145) et ceux d'ADAMS (2). Dans la «toxohormone» isolée il y avait toujours une importante part d'acides nucléiques; mais on sait depuis les travaux d'ENDO (104) que les acides nucléiques ne constituent pas la partie active de la toxohormone et qu'elle est en réalité de nature polypeptidique (292). Bien que les acides nucléiques ne semblent pas faire partie de la fraction active de la toxohormone, les acides nucléiques de la tumeur dont on connaît l'intense métabolisme interviennent peut-être à la production de cette substance qui, à son tour, agirait sur le métabolisme des acides nucléiques des tissus de l'hôte; ceci romperait les équilibres cellulaires et contribuerait à la réalisation de l'état de cachexie final de l'animal porteur de tumeur.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Nous avons étudié quelques aspects de la régulation de la biosynthèse d'ARN de la cellule hépatique normale non en prolifération et de la cellule tumorale homologue à multiplication intense.

Nous avons d'abord envisagé un point de vue moléculaire de la régulation de la biosynthèse de l'ARN en étudiant l'ajustement du pool des nucléotides.

Nous avons retrouvé pour l'hépatome de Zajdela une répartition de nucléotides libres se rapprochant de celle du type métabolique qui est le mieux représenté par le foie normal. Mais la cellule hépatique tumorale se distingue de la cellule homologue normale et même du foie en régénération, par une plus grande richesse en nucléosides triphosphates. Ces constatations témoignent d'un ajustement à une synthèse plus importante des ARN.

L'étude des nucléotides libres a révélé en outre que dans la tumeur il y a diminution des uridines-coenzymes par rapport au foie normal ou au foie en régénération. Or, ces composés jouent un rôle capital dans de nombreuses réactions de métabolismes spécialisés et en particulier de la synthèse des membranes intracellulaires. L'utilisation préférentielle de l'ATP, CTP, UTP et GTP pour la synthèse de l'ARN, réduit la synthèse des nucléosides diphosphates coenzymes et a pour conséquence la dédifférentiation fonctionnelle et morphologique. Dans le foie en régénération qui produit des cellules différenciées, le taux de nucléosides triphosphates utilisés à la fois pour la synthèse de l'ARN et pour celle des diphosphocoenzymes, se trouve rapidement épuisé. On pourrait ainsi envisager un mécanisme intervenant dans l'arrêt de la croissance normale.

Parmi les différences significatives enregistrées entre le pool des nucléotides libres de la cellule hépatique normale et cancéreuse, il y a l'importante diminution de NAD et NADP dans la cellule tumorale. Cette caractéristique a été postulée pour toutes les cellules cancéreuses.

Le traitement à la nicotinamide de rats porteurs de l'hépatome de Zajdela provoque une néosynthèse de NAD beaucoup plus faible dans la tumeur que dans le foie normal. Contrairement à ce qui était attendu, la présence de l'hépatome n'a pas influencé, de façon significative la néosynthèse de NAD dans le foie d'animaux porteurs de tumeur.

A la suite d'administration massive de nicotinamide, il y a inhibition du turnover de l'ARN du foie tandis que celui de l'hépatome n'est pas touché. Ainsi se confirme l'hypothèse formulée par Revel (318) et collaborateurs d'une corrélation entre la biosynthèse d'ARN et NAD. L'administration de nicotinamide n'a pas d'efficacité sur le renouvellement de l'ARN si elle n'est pas suivie de néosynthèse intense de NAD.

Dans une deuxième étape nous avons envisagé l'étude de la biosynthèse de l'ARN à l'échelle cellulaire.

Dans une étude préliminaire nous avons vu que le rapport ARN/ADN est beaucoup plus élevé dans le noyau tumoral qui s'avère plus riche en ARN que le noyau homologue sain, non proliférant.

La constitution de l'ARN nucléaire total a révélé la prédominance d'ARN à type A + U dans l'ascite de Zajdela par rapport à celle du foie normal.

La chromatographie sur colonne d'albumine méthylée n'a pas révélé de différences fondamentales entre les deux types d'ARN nucléaires analysés. L'ARN le plus lourd montre l'incorporation la plus forte de marqueur radioactif. Elle semble correspondre vraisemblablement à l'ARN messager.

Nous avons montré qu'il existe des différences significatives dans la répartition des ARN des divers compartiments nucléaires de la cellule cancéreuse comparée à la cellule homologue normale. On note un enrichissement d'ARN ribosomal et d'ARN soluble dans le suc nucléaire. Ce fait apporte une confirmation du métabolisme intense de l'ARN de la cellule cancéreuse si l'on admet que ce compartiment nucléaire constitue la voie de passage de l'ARN synthétisé dans le noyau vers le cytoplasme.

A l'opposé l'ARN lié à l'ADN de l'hépatome est à un taux plus faible que dans les cellules du foie. Ceci est à mettre en relation avec la dédifférentiation cellulaire accompagnée de simplifications de métabolismes et d'une réduction de la gamme des ARN messagers produits par la cellule tumorale.

L'étude de l'incorporation de précurseur radioactif dans les divers compartiments nucléaires a été effectuée dans le but de préciser le «site» initial de synthèse de l'ARN. Cette étude a montré le renouvelle-

ment intense des ARN nucléolaires comparé à celui de l'ARN chromosomal et à celui du suc nucléaire. Les ARN des diverses fractions subnucléaires ont un comportement similaire dans la cellule hépatique normale et tumorale. Cependant au même délai, le marquage de chaque type d'ARN nucléaire est plus intense dans la cellule tumorale par rapport à la cellule homologue normale.

L'incubation de noyaux hépatiques sains et tumoraux *in vitro* a révélé une migration extrêmement rapide dans l'espace extranucléaire d'un ARN marqué au bout d'une minute de contact avec le précurseur radioactif et d'une fraction de l'ADN à renouvellement plus rapide que l'ADN chromosomal. Le rôle biologique de cet ADN à marquage rapide reste encore à préciser.

Dans la fraction chromosomale nous avons mis en évidence l'existence d'un hybride ARN-ADN naturel.

Dans la fraction nucléolaire nous avons trouvé la présence d'un ADN particulier à renouvellement beaucoup plus rapide que celui de la fraction chromosomale.

Dans une troisième partie de notre travail nous avons étudié quelques aspects de la régulation de la biosynthèse de l'ARN au niveau de l'organe entier de l'animal.

La comparaison quantitative des acides nucléiques et leur renouvellement dans l'hépatome de Zajdela et dans le foie chez le même animal a révélé que l'ascite de Zajdela est le siège de synthèses particulièrement intenses, puisque la quantité d'ADN de la tumeur élaborée en cinq à six jours équivaut à celle d'un foie entier adulte. Mais le rapport ARN/ADN dans la cellule tumorale est nettement inférieur à celui du foie normal, témoignant d'une synthèse plus grande de l'ADN comparé à celle de l'ARN. C'est évidemment l'opposé de ce qu'on voit dans les cellules normales des organes au repos. Les valeurs très élevées trouvées pour l'activité spécifique relative de l'ADN et de l'ARN de la tumeur confirment les données quantitatives.

La composition en mononucléotides de l'ARN total de la cellule tumorale révèle une diminution significative du GMP par rapport à celle du foie total.

Le jeûne protéique prolongé freine le développement de la tumeur en réduisant la synthèse nette de l'ARN et de l'ADN sans toutefois empêcher son développement. Il faut donc admettre que la tumeur prélève les acides aminés indispensables pour ses synthèses protéiques sur les protéines de l'animal-hôte.

Parallèlement nous avons enregistré un accroissement du renouvellement de l'ARN et de l'ADN dans la tumeur d'animaux carencés en protéines alimentaires. Ceci reflète vraisemblablement d'une augmentation de fréquence de la synthèse d'ARN et de la labilité des ARN au cours de la carence protéique.

Nous avons également noté une élévation du turnover de l'ARN dans le foie des animaux ascitiques et soumis au jeûne protéique comparé à celui des animaux hébergeant l'hépatome de Zajdela et nourris avec un régime complet. Le renouvellement de l'ADN et la quantité d'ADN diminuent dans le foie des animaux carencés et porteurs de tumeurs par rapport aux rats cancéreux témoins.

Enfin nous avons étudié l'effet de la présence de la tumeur sur le métabolisme nucléique des organes de l'hôte. L'effet tumeur-hôte se traduit au niveau du foie et du pancréas par une augmentation des quantités d'acides nucléiques et de leur renouvellement. Il en est de même du tissu endocrinien surrénalien. Par contre des organes, tel le rein, ne semblent pas être touchés par la présence d'une croissance maligne dans l'organisme hôte. Ces résultats sont à rapprocher d'un fait bien connu, que les tumeurs spontanées se manifestent le plus souvent dans les tissus où persiste, même chez l'animal adulte, un taux de prolifération cellulaire permanent (pancréas, foie, épithélium gastro-intestinal, surrénales) ou cyclique (utérus, sein). A l'opposé les tumeurs sont plus rares dans le rein ou le muscle, bien que ce dernier constitue presque la moitié de la masse de l'organisme. Les effets de la présence de la tumeur, soit de facteur stimulant la prolifération cellulaire, paraît se manifester seulement au niveau d'organes, dans lesquels un certain degré de prolifération cellulaire est maintenu.

Notre travail, qui avait pour objet une étude comparée de quelques aspects de la régulation de la biosynthèse de l'ARN dans la cellule hépatique normale et tumorale, s'est révélé fructueux à deux points de vue. D'une part, nous avons pu mettre en évidence des différences significatives à l'échelle moléculaire, cellulaire et à l'échelle de l'organe entre les deux types de cellules étudiées. D'autre part, les résultats obtenus par l'étude de fractions subnucléaires ont montré l'existence d'un ADN à renouvellement rapide et d'un hybride naturel ARN-ADN, faits qui sont communs aux cellules normales et tumorales.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Abdel-Kader M. M., Gundy A., Mahfouz M. M., Alexandria Med. J. (1962) *8*, 1.
2. Adams D. H., Brit. J. Cancer (1952) *5*, 115.
3. Adams H. R., Busch H., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1962) *9*, 578.
4. Allara E., Sperimentale (1956) *106*, 1.
5. Allfrey V. G., Mirsky A. E., Proc. Nat. Acad. Sci. (1957) *43*, 589.
6. Allfrey V. G., Mirsky A. E., Proc. Nat. Acad. Sci. (1957) *43*, 821.
7. Amano M., Leblond C. P., Exp. Cell. Res. (1960) *20*, 250.
8. Anderson E. P., Yen C. Y., Mandel H. G., Smith P. K., J. Biol. Chem. (1955) *213*, 625.
9. Anderson N. G., Ladd F. C., Biochim. Biophys. Acta (1962) *55*, 275.
10. Annau E., Manginelli A., Roth A., Cancer Research (1951) *11*, 304.
11. Appleman D., Skavinski E. R., Stein A. M., Cancer Research (1951) *11*, 926.
12. Babson A. L., Cancer Research (1954) *14*, 89.
13. Balis M. E., Praag D. V., Aezen F., Cancer Research (1956) *16*, 628.
14. Ball H. A., Samuels L. T., Proc. Soc. Exptl. Biol. Méd. (1938) *38*, 441.
15. Barlett G. R., J. Biol. Chem. (1959) *234*, 465.
16. Bassham J. A., Birt L. M., Hems R., Loening U. E., Biochem. J. (1959) *73*, 491.
17. Beau G., Le Cancer. — Le Rayon de la Science (1961).
18. Begg R. W., Cancer Research (1951) *11*, 341.
19. Begg R. W., Proc. Am. Assoc. Cancer Research (1953) *1*, 4.
20. Begg R. W., Proc. Can. Cancer Research Conf. 1 st Conf. Honey Harbour, Ontario (1954) 237.
21. Beljanski M., Bull. Soc. Chim. Biol. (1961) *43*, 1017.
22. Berenblum J., Chain E., Biochem. J. (1938) *32*, 286.
23. Berenblum I., Chain E., Heatley N. G., Biochem. J. (1939) *33*, 68.
24. Bergkvist R., Acta Chem. Scand. (1956) *10*, 1303.
25. Bernfield P., Nisselbaum J. S., Berkeley B. J., Hanson R. W., J. Biol. Chem. (1960) *235*, 2856.
26. Bernhard W., Bauer A., Gropp A., Haguenau F., Oberling C., Exp. Cell. Res. (1955) *9*, 88.
27. Bernhard W., Haguenau F., Oberling C., Experientia (1952) *8*, 58.
28. Bernheim F., Felsovanyi A. V., Science (1940) *91*, 76.
29. Bessmann M. J., Lehmann I. R., Simms E. S., Kornberg A., Feder. Proc. (1957) *16*, 153.
30. Bevilacqua L., Vaccari L., Conte G., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. (1951) *27*, 1249.
31. Bishop C. W., Davidson J. N., Brit. J. Radiol. (1957) *30*, 367.
32. Bock R. M., Nan-Sing Ling, Morell S. A., Lipton S. H., Arch. Biochem. Biophys. (1956) *62*, 253.
33. Boivin A., Vendrely R., Vendrely C., Comp. Rend. Acad. Sci. (1948) *226*, 1061.
34. Bourdet A., Mandel P., Comp. Rend. Acad. Sci. (1953) *237*, 530.
35. Bourdet A., Thèse de doctorat ès-sciences (1956), Paris, 165 pages dactylographiées.

36. Borst P., Een biochemisch onderzoek over mitochondueen geisoleerd nitten ascites-cel tumor. M. D. Thèse - Jacob van Campen - Amsterdam (1961).
37. Borst P., Colpa-Boonstra J. P., Biochim. Biophys. Acta (1962) *56*, 216.
38. Branster M. J., Morton R. K., Biochem. J. (1956) *63*, 640.
39. Brachet J., Arch. Biol. (1942) *53*, 207.
40. Brachet J., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. (1947) *12*, 18.
41. Brachet J., Chantrenne H., Vanderhaeghe F., Biochim. Biophys. Acta (1955) *18*, 544.
41a. Brenman M. J., Simpson W. L., Biological Interactions in normal and neoplastic growth. Little Brown and Cie. Boston Mass (1962).
42. Briggs A. P., J. Biol. Chem. (1922) *53*, 13.
43. Brody S., Acta Chemica Scand. (1953) *7*, 502.
44. Brody S., Nature (1958) *182*, 1386.
45. Brownhill T. J., Jones A. S., Stacey M., Biochem. J. (1959) *73*, 434.
46. Brues A. M., Tracy M. M., Cohn W. E., J. Biol. Chem. (1944) *155*, 619.
47. Brumm A. F., Potter V. R., Siekevitz P., J. Biol. Chem. (1956) *220*, 713.
48. Bull A. B., Neurath H., J. Biol. Chem. ~~J. Biol. Chem.~~ (1937) *118*, 163.
49. Burgh P. M. de - Austral. J. Sc. (1957) *20*, 86.
50. Burma D. P., Kröger H., Ochoa S., Warner R. C., Weill J. D., Proc. Nat. Acad. Sci. (1961) *47*, 749.
51. Burton K., Biochem. J. (1956) *62*, 315.
52. Busch E. W., Scheitza H., Thorn W., Biochem. Z. (1961) *335*, 62.
53. Busch-Salmon S., Thèse de Doctorat ès-Sciences, Strasbourg (1963), 100 pages dactylographiées.
54. Busch S., Weill J. D., Ledig M., Mandel P., Bull. Soc. Chim. Biol. (1958) *40*, 1487.
55. Busch S., Chambon P., Mandel P., Weill J. D., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1962) *7*, 255.
56. Butler J. A., John E. W., Lucy J. A., Simson P., Brit. J. Cancer (1956) *10*, 202.
57. Cabib E., Leloir L. R., Cardini C. E., J. Biol. Chem. (1953) *203*, 1055.
58. Campbell R. M., Kosterlitz H. W., J. Physiol. (1947) *106*, 12*P*.
59. Canellakis E. S., Biochim. Biophys. Acta (1957) *25*, 217.
60. Canterow A., Paschkis K. E., Williams T. L., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1959) *1*, 75.
61. Canterow A., Williams T. L., Paschkis K. E., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1961) *4*, 156.
62. Carruthers C., Suntzeff V., Arch. Biochem. Biophys. (1953) *45*, 140.
63. Carruthers C., Suntzeff V., Cancer Research (1954) *14*, 29.
64. Carruthers C., Suntzeff V., Harris P. N., Cancer Research (1954) *14*, 849.
65. Caspersson T., Schultz J., Nature (1939) *143*, 602.
66. Caspersson T., Nyström C., Santesson L., Naturwissenschaften (1941) *29*, 29.
67. Caspersson T., Brandt K., Protoplasma (1941) *35*, 507.
68. Cerecedo L. R., Reddy D. V. N., Pircio A., Lombardo M. E., Travers J. J., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1952) *78*, 683.
69. Cerecedo L. R., Lombardo M. E., Reddy D. V. N., Travers J. J., Proc. Soc. Exp. Biol (1952) *80*, 648.
70. Cerecedo L. R., Reddy D. V. N., Lombardo M. E., Mc Carthy P. T., Travers J. J., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1952) *80*, 723.
71. Cerecedo L. R., Bresnick E. Schubert E. T., Arch. Biochem. Biophys. (1959) *83*, 44.
72. Cerecedo L. R., Smith M. J., Vicente J., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1960) *3*, 328.
73. Chambon P., Mandel P., Bull. Soc. Chim. Biol. (1959) *41*, 715.
74. Chargaff E., Magasanik B., Visher E., Green C., Doniger R., Elson D., J. Biol. Chem. (1950) *186*, 51.
75. Chauveau J., Moule Y., Rouiller C., Exp. Cell. Res. (1956) *11*, 317.

76. Chauveau J., Moule Y., Rouiller Ch., Bull. Soc. Chim. Biol. (1957) *39*, 1521.
77. Chen P. S., Toribara T. Y., Warner H., Analyt. Chem. (1956) *28*, 1756.
78. Cheng P. Y., Biochim. Biophys. Acta (1961) *53*, 235.
79. Chipchase M. I. H., Birnstiel M. L., Proc. Nat. Acad. Sci. (1963) *49*, 692.
80. Ciotti M. M., Kaplan N. O., Methods in Enzymology Acad. Press New-York (1957), Vol. III, 890.
81. Clark G. A., Goodlad J., Brit. J. Cancer (1960) *14*, 327.
82. Cohn W. E., J. Am. Chem. Soc. (1950) *72*, 1471.
83. Cohn W. E., J. Cell. Comp. Physio. (1951) *38*, 21.
84. Cohn W. E., Volkin E., Nature (1951) *167*, 487.
85. Colowick P. S., Kaplan N. O., Ciotti M. M., J. Biol. Chem. (1951) *191*, 447.
86. Coolsma J. M., Ab G., Campagne R. N., Gruber M., Biochim. Biophys. Acta (1963) *72*, 494.
87. Crane R. K., Lippmann F., J. Biol. Chem. (1953) *201*, 235.
88. Crestfield A. M., Smith K. C., Allen F. W., J. Biol. Chem. (1955) *216*, 185.
89. Daoust R., Cantero A., Cancer Research (1955) *15*, 734.
90. Davidson J. N., Waymouth C., Biochem. J. (1944) *38*, 384.
91. Davidson J. N., Smellie R. M. S., Biochem. J. (1952) *52*, 594.
92. Davidson J. N., Smellie R. M. S., Biochem. J. (1952) *52*, 599.
93. Davidson J. N., Proc. Royal Soc. Med. (1955) *48*, 910.
94. Delsal J. L., Manhouri H., Bull. Soc. Chem. Biol. (1955) *37*, 1041.
95. Desjardins R., Smetana K., Steele W. J., Busch H., Cancer Research (1963) *23*, 1819.
96. Devik F., Elson L. A., Koller P. C., Lamerton L. F., Brit. J. Cancer (1950) *4*, 298.
97. Dickens F., Weil-Malherbe H., Cancer Research (1943) *3*, 73.
98. Dische Z., Mikrochemie (1930) *2*, 4.
99. Doty P., Mc. Gill B. B., Rice S. A., Proc. Nat. Acad. Sci. (1958) *44*, 482.
100. Dounce A. L., J. Biol. Chem. (1943) *151*, 221.
101. Edlbacher S., Jucker P., Z. Physiol. Chem. (1936) *240*, 78.
102. Elson L. A., Haddow A., Brit. J. Cancer (1947) *1*, 97.
103. Elwyn D., Sprinson D. B., J. Am. Soc. (1950) *72*, 3317.
104. Endo H., Gann (1954) *45*, 124.
105. Eränko O., Acta Anat. (Basel) (1954) *22*, 331.
106. Errera M., Hell A., Perry R. P., Biochim. Biophys. Acta (1961) *49*, 58.
107. Euler H., Schmidt G., Z. Physiol. Chem. (1934) *223*, 215.
108. Euler H., Schlenk F., Heiwinkel H., Högberg B., Hoppe Seyler's Z. Phys. Chem. (1938) *256*, 208.
109. Euler H., Hevesy G., Arkiv. Kemi Mineral Geol. (1944) 17A n° 30.
110. Fellig J., Wiley C., Arch. Biochem. Biophys. (1959) *85*, 313.
111. Fiala S., Fiala A. E., Glinsmann W., Path. et biol. Semaine hôp. (1961) *9*, 613.
112. Fischer A., Schlenk F., Texas Rep. Biol. and Med. (1948) *6*, 346.
113. Fisher R. A., "Statistical Methods for Research Workers", traduction Y. Bertrand (Presses Universitaires) (1947).
114. Fleckenstein A., Janke J., Pflügers Arch. ges. Physiol. (1953) *258*, 177.
115. Folch J., Lees M., Stanley G. H. S., J. Biol. Chem. (1957) *226*, 497.
116. Fraenkel-Conrat H., Ramachandran L. R., Adv. in Prot. Chem. (1959) *14*, 175.
117. Fraenkel-Conrat H., Singer B., Tsugita A., Virology (1961) *14*, 54.
118. Frederick G. L., Begg R. W., Cancer Research (1956) *16*, 548.
119. Frenster J. H., Allfrey V. G., Mirsky A. E., Proc. Nat. Acad. Sci. (1960) *46*, 432.
120. Fujita S., Takamoto K., Nature (1963) *200*, 494.
121. Fujiwara T., Nakahara W., Kishi S., Gann (1937) *31*, 51.
122. Fukuda M., Sibatani A., J. Bioch. Jap. (1958) *40*, 95.

123. Furieri P., Boll. Dell. Soc. Ital. Biol. Sper. (1957) *33*, 260.
124. Furlong N. B., Watson E. P. P., Davis W. E., Griffin A. C., Cancer Research (1955) *15*, 710.
125. Furlong N. B., Wania A. F., Griffin A. C., Proc. Soc. Exp. Med. Biol. (1955) *90*, 7.
126. Furst S. S., Brown G. B., J. Biol. Chem. (1951) *191*, 239.
127. Gall J. G. et Callan H. G., Proc. Nat. Acad. Sci. (1962) *48*, 562.
128. Georgiev G. P., Samarina O. P., Biochemistry (1962) *26*, 401.
129. Georgiev G. P., Mantieva V. L., Biochim. Biophys. Acta (1962) *61*, 153.
130. Georgiev G. P., Mantieva V. L., Biochemstry (1962) *26*, 143.
131. Georgiev G. P., Samarina O. P., Lerman M. I., Smirnov M. N., Severtzov A. N., Nature (1963) *200*, 1291.
131a. Gigot C., Colloque de Biologie Moléculaire, Orsay, octobre 1964.
132. Gilbert D., Yemm F., Nature (1958) *182*, 1745.
133. Glock G. E., Mc Lean P., Biochem. J. (1955) *61*, 381.
134. Glock G. E., Mc Lean P., Biochem. J. (1957) *65*, 413.
135. Gold N. I., Sturgis S. H., J. Biol. Chem. (1952) *196*, 143.
136. Gold N. I., Sturgis S. H., J. Biol. Chem. (1954) *206* 51.
137. Goldstein L., Plaut W., Proc. Nat. Acad. Sci. (1955) *41*, 874.
138. Goldstein L., Micou J., J. Biophys. Biochem. Cyt. (1959) *6*, 301.
139. Goldstein L., Cailleau R., Crocker T. T., Exp. Cell. Res. (1960) *19*, 332.
140. Granboulan N., Granboulan P., Exp. Cell. Res. (1964) *34*, 71.
141. Green J. W., Lusbauch C. C., Cancer Research (1949) *9*, 692.
142. Green J. W., Benditt E. P., Humphreys E. M., Cancer Research (1950) *10*, 769.
143. Greenfield R. E., Meister A., Cancer Research (1950) *10*, 222.
144. Greenfield R. E., Meister A., J. Nat. Cancer Inst. (1951) *11*, 997.
145. Greenstein J. P., Biochemistry of Cancer 2nd ed. Acad. Press New-York, 1954.
146. Greenstein J. P., Cancer Research (1956) *16*, 641.
147. Gregoire J., Biochem. Biophys. Acta (1961) *47*, 27.
148. Gregoire J., Limouzin N., Gregoire J., Bull. Soc. Chim. Biol. (1962) *44*, 765.
149. Gregoire J., Limouzin N., Gregoire J., Bull. Soc. Chim. Biol. (1962) *44*, 798.
150. Griffin A. C., Cunningham L., Brandt E. L., Kupke D. W., Cancer (1951) *4*, 410.
151. Gros F., Gilbert W., Hiatt H., Attardi G., Spahr P. F., Watson J. D., Cold Spring Harbor Sympos. on quant. Biology New-York (1961) *26*, 111.
152. Gros F., Hiatt H. H., Gilbert C., Kurland G., Risebrough R. W., Watson J. D., Nature (1961) *190*, 581.
153. Grosbie G. W., Smellie R. M. S., Davidson J. N., Biochem. J. (1953) *54*, 287.
154. Grunberg-Manago M., Ochoa S., J. Am. Chem. Soc. (1955) *77*, 3165.
155. Gudbjarnason S., de Schyver C., Biochem. Biophys. Res. Com. (1964) *14*, 12.
156. Hamilton L. D., Fuller W., Reich E., Nature (1963) *198*, 538.
157. Hansen R. G., Hageman G., Arch. Biochem. Biophys. (1954) *62*, 511.
158. Harel J., Harel L., Lacour F., Imbenotte J., Compt. Rend. Acad. Sci. (1963) *256*, 1624.
159. Harris H., Fisher H. W., Rodgers A., Spencer T., Watts J., Proc. Roy. Soc. (1963) *157b*, 177.
160. Harris H., Davidson J. N., Cohn W. E., Progress in Nucleic Research Acad. Press New-York (1963) 2, 19.
161. Harshaw J. P., Brown R. A., Graham A. F., Anal. Biochem. (1962) *4*, 182.
162. Hemingway J. T., Nature (1960) *185*, 106.
163. Henney H. R., Storck R., Science (1963) *142*, 1675.
164. Herich R., Naturwissenschaften (1963) *50*, 625.

165. Hevesy G., Advances in Biol. Med. Physics (1948) *1*, 409.
166. Hevesy G., Radioactive Indicators Interscience Publishers New-York (1948).
167. Hiatt H., J. Mol. Biol. (1962) *5*, 217.
168. Higgins G. M., Anderson R. M., Arch. Path. (1931) *12*, 186.
169. Hill M., Miller-Faures A., Errera M., Biochim. Biophys. Acta (1964) *80*, 39.
170. Hitchborn J. H., Dunn D. B., Biochim. Biophys. Acta (1963) *68*, 139.
171. Hoagland M. B., Keller E. B., Zamecnik P. C., J. Biol. Chem. (1956) *218*, 345.
172. Hogeboom G. H., Schneider W. C., J. Biol. Chem. (1952) *197*, 611.
173. Hohorst H. J., Kreutz F. H., Bucher Th., Biochem. Z. (1959) *332*, 18.
174. Holzer H., Sedlmayer G., Kiese M., Biochem. Z. (1956) *328*, 176.
175. Holzer H., Busch D., Kröger H., Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. (1958) *313*, 184.
176. Holzer H., Friedrich G., Grisebach H., Biochim. Biophys. Acta (1961) *51*, 600.
177. Horie S., Terada S. I., J. Biochem. Jap. (1960) *47*, 335.
178. Horie S. J. Biochem. Jap. (1960) *47*, 429.
179. Horrocks R. H., Nature (1949) *164*, 444.
180. Hotchkiss R. D., J. Biol. Chem. (1948) *175*, 315.
181. Hradec J., Acta Unio Intern. contra cancrum (1960) *16*, 1146.
182. Huang R. C., Bonner J., Proc. Nat. Acad. Sci. (1962) *48*, 1216.
183. Hurlbert R. B., Schmitz H., Brumm A. G., Potter V. R., J. Biol. Chem. (1954) *209*, 23.
184. Hurvitz J., Bresler A., Diringer R., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1960) *3*, 15.
185. Inoue T., Aoki T., Tsubo Mura I., Mabuchi M., Nara Igaku Zasshi (1959) *9*, 349.
186. Ishihama A., Mizuno N., Takai M., Otaka E., Osawa S., J. Mol. Biol. (1962) *5*, 251.
187. Jacob F., Monod F., J. Mol. Biol. (1961) *3*, 318.
188. Jacob M., Mandel L., Mandel P., Experientia (1951) *7*, 269.
189. Jacob M., Thèse de Doctorat ès-sciences Strasbourg (1953), 203 pages dactylographiées.
190. Jacobson K. S., Astrachan L., Arch. Biochem. Biophys. (1957) *71*, 69.
191. Jedeikin L. A., Weinhouse S., J. Biol. Chem. (1955) *213*, 271.
192. Jedeikin L. A., Thomas A. J., Weinhouse S., Cancer Research (1956) *16*, 867.
193. Johnson E. A. "The Nucleic Acids" (Chargaff E. and Davidson J. N.) Acad. Press New-York (1955) *1*, 502.
194. Kalckar H. M., J. Biol. Chem. (1947) *167*, 429.
195. Kaplan N. O., Goldin A., Humphreys S. R., Ciotti M. M., Venditti J. M., Science (1954) *120*, 437.
196. Kaplan N. O., Goldin A., Humphreys S. R., Ciotti M. M., Stolzenbach F. E., J. Biol. Chem. (1956) *219*, 287.
197. Kay E. R. M., Dounce A. L., J. Am. Chem. Soc. (1953) *75*, 4041.
198. Kelly L. S., Jones H. B., Science (1950) *111*, 333.
199. Kelly L. S., Payne A. H., White M. R., Jones H. B., Cancer Research (1951) *11*, 694.
200. Kellsall M. A., Acta Unio Intern. contra Cancrum (1952) *7*, 776.
201. Kempf J., Communication personnelle.
202. Kersten W., Kersten H., Hoppe Seyler's Z. Phys. Chem. (1962) *330*, 21.
203. Khouvine Y., Mortreuil M., Comp. Rend. Acad. Sci. (1954) *238*, 2129.
204. Khouvine Y., Proc. Intern. Conf. Sci. Research 1st. (1958) *3*, 322,
205. Kidson C., Kirby K. S., Ralph R. K., J. Mol. Biol. (1963) *7*, 312.
206. Kirby K. S., Biochim. Biophys. Acta (1955) *18*, 575.
207. Kirby K. S., Biochem. J. (1956) *64*, 405.
208. Kirby K. S., Biochim. Biophys. Acta (1960) *40*, 193.
209. Kirby K. S., Biochim. Biophys. Acta (1962) *55*, 545.

215 a KONRAD M.W. STENT. G.S. Proc. Nat Acad. Sci (1964) 51, 647
210. Kit S., Griffin A. C., Cancer Research (1958) *18*, 629.
211. Kit S., Arch. Biochem. Biophys. (1960) *88*, 1.
212. Klenov H., Biochim. Biophys. Acta (1959) *35*, 412.
213. Klethi J., Mandel P., Biochim. Biophys. Acta (1957) *24*, 642.
214. Klingenberg M., 11e Coll. Gesell. Physiol. Chemie Mosbach/Baden April 1960 Springer Verlag (1961) 82.
215. Kohmann T. P., Rusch H. P., Proc. Soc. Expl Biol. Med. (1941) *46*, 403.
216. Kornberg A., J. Biol. Chem. (1948) *176*, 665.
217. Kornberg A., J. Biol. Chem. (1950) *182*, 779.
218. Kröger H., Rotthauwe H. W., Ulrich B., Holzer H., Biochem. Z. (1960) *333*, 148.
219. Kröger H., Rotthauwe H. W., Ulrich B., Holzer H., Biochem. Z. (1960) *333*, 155.
220. Lamirande G. de, Allard C., Cantero A., J. Biol. Chem. (1955) *214*, 519.
221. Langan T. A., Kaplan N. O., Shuster L., J. Biol. Chem. (1959) *234*, 2161.
222. Laskov R., Margoliash E., Littauer U. Z., Eisenberg H., Biochem. Biophys. Acta (1959) *33*, 247.
223. Le Page G. A., Cancer Research (1948) *8*, 193.
224. Le Page G. A., Cancer Research (1950) *10*, 393.
225. Le Page G. A., Heidelberger C., J. Biol. Chem. (1951) *188*, 593.
226. Le Page G. A., Potter V. R., Busch H., Heidelberger C., Hurlbert R. B., Cancer Research (1952) *12*, 153.
227. Lettré R., Siebs W., Z. Krebsforsch. (1954) *60*, 19.
228. Lettré R., Chemotherapia (1961) *2*, 223.
229. L'Heritier Ph., Les méthodes statistiques dans l'expérimentation biologique CNRS (1949).
230. Littauer U. Z., Eisenberg H., Biochim. Biophys. Acta (1959) *32*, 320.
231. Logan R., Davidson J. N., Biochim. Biophys. Acta (1954) *24*, 196.
232. Logan R., Ficq A., Errera M., Biochim. Biophys. Acta (1959) *31*, 402.
233. Lombardo M. E., Travers J. J., Cerecedo L. R., J. Biol. Chem (1952) *195*, 43.
234. Love R., Bharadwaj T. P., Nature (1959) *183*, 1453.
235. Mac Carty W. C., Am. J. Cancer (1936) *26*, 529.
236. Mac Carty W. C., Am. J. Cancer (1937) *31*, 104.
236a. Mc Conkey E. H., Hopkins J. W., Proc. Nat. Acad. Sci. (1964) *51*, 1197.
237. Mc Even C. S., Selye H., Am. J. Med. Sci. (1935) *189*, 423.
238. Mc Even H. D., Haven F. L., Cancer Research (1941) *1*, 148.
239. Mc Farlane E. S., Fraser M. J., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1964) *15*, 351.
240. Machebœuf M., Delsal J., Bull. Soc. Chim. Biol. (1943) *25*, 116.
241. Magasanik B., Visher E., Doniger R., Elson D., Chargaff E., J. Biol. Chem. (1950) *186*, 37.
242. Maggio R., Siekevitz P., Palade G. E., J. Cell. Biol. (1963) *18*, 293.
243. Malgren R. A., Cancer Research (1956) *16*, 232.
244. Mandell J. D., Hershey A. D., Anal. Biochem. (1960) *1*, 66.
245. Mandel P., Mandel L., Jacob M., Compt. Rend. Acad. Sci. (1948) *226*, 2019.
246. Mandel P., Borkowska I., Biochim. Biophys. Acta (1964), sous presse.
247. Mandel P., Jacob M., Mandel L., Bul. Soc. Chim. Biol. (1950) *32*, 80.
248. Mandel P., Jacob M., Mandel L., Compt. Rend. Acad. Sci. (1954) *238*, 288.
249. Mandel P., Jacob M., Mandel L., J. Physiol. (1955) *47*, 236.
250. Mandel P., Chambon P., Immediate and low effects of ionizing radiations Venise Supp. J. Rad. Biology (1959), 71.
251. Mandel P., Chambon P., Wintzerith M., Klein N., Mandel L., Compt. Rend. Acad. Sci. (1959) *249*, 582.

252. Mandel P., Klein N., Wintzerith M., Mandel L., Lipovsky A., V^e Congrès Intern. Biochimie Moscou (1961), Rés. Communications p. 75 n° 3-64-1222.
253. Mandel P., Wintzerith M., Pete-Klein N., Mandel L., VI^e Congrès Intern. Biochimie New-York (1964).
254. Mandel P., Bull. Soc. Chim. Biol. (1964) *46*, 43.
255. Markham R., Smith J. D., Biochem. J. (1951) *49*, 401.
256. Marmur J., J. Mol. Biol. (1961) *3*, 208.
257. Marshak A., J. Gen. Physiol. (1941) *25*, 275.
258. Masamune H., Kaketa H., Abe S., Tohoku J. Exptl. Med. (1958) *68*, 321.
259. Masayama T., Yokoyama T., Gann (1940) *34*, 174.
260. Mascitelli-Coriandoli E., Naturwissenschaften (1959) *46*, 561.
261. Maver M. E., Dunn T. B., Greco A. E., J. Nat. Cancer Inst. (1945) *6*, 49.
262. Mead C. G., J. Biol. Chem. (1964) *239*, 550.
263. Mider G. B., Tesluk H., Morton J. J., Acta Unio intern. contra cancrum (1948) *6*, 409.
264. Mider G. B., Cancer Research (1951) *11*, 821.
265. Mills G. T., Smith E. E., Science (1951) *114*, 690.
266. Mirsky A. E., Osawa S., Allfrey V. G., Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. (1956) *21*, 49.
267. Mejbaum W., Z. Physiol. Chem. (1937) *258*, 117.
268. Mejbaum W., Biokhimiya (1945) *10*, 353.
269. Monier R., Biochim. Biophys. Acta (1962) *55*, 1001.
270. Monier R., Naono S., Hayes D., Hayes F., Gros F., J. Mol. Biol. (1962) *5*, 311.
271. Montgomery P. O'B., Exp. Cell. Res. (1961) *24*, 1.
272. Montreuil J., Segard E., Compt. Rend. Acad. Sci. (1961) *252*, 4217.
273. Monty K. J., Litt M., Kay E. R. M., Dounce A. L., J. Biophys. Biochem. Cytol. (1956) *2*, 127.
274. Moriyama A., Mitsuhashi M., Ohtsuka H., Ohmura S., Miura Y., J. Biochem. jap. (1963) *54*, 81.
275. Morton R. K., Nature (1958) *181*, 540.
276. Mortreuil M., Khouvine Y., Bull. Soc. Chim. Biol. (1957) *39*, 161.
277. Munro H. N., Naismith J. D., Wikramanayaka T. W., Biochem. J. (1953) *54*, 198.
278. Munro H. N., Clark C. M., Proc. Nutr. Soc. (1958) *17*, XXIV.
279. Munro H. N., Clark C. M., Brit. J. Cancer (1959) *13*, 324.
280. Nakahara W., Fukuoka F., Japon. Med. J. (1948) *1*, 271.
281. Nakahara W., Fukuoka F., Gann (1949) *40*, 45.
282. Nakahara W., Fukuoka F., Gann (1950) *41*, 47.
283. Nakahara W., Fukuoka F., Gann (1954) 45, 67.
284. Nakahara W., Fukuoka F., Gann (1954) *45*, 77.
285. Naora H., Richter G., Naora H., Exp. Cell. Res. (1959) *16*, 434.
286. Narurkar M. V., Kumta U. S., Sahasrabudhe M. B., Brit. J. Cancer (1957) *11*, 482.
287. Nicholls D., Heagy F. C., Rossiter R. J., Can. J. Biochem. Phys. (1956) *34*, 543.
288. Nixon J. C., Zbarsky S. H., Can. J. of Biochem. Phys. (1963) *41*, 2237.
289. Nodes J. T. et Reid E., Biochem. J. (1962) *83*, 4P.
290. Oberling C., Bernard W., The Cell. Brachet J., Mirsky A. E. Acad. Press. New-York (1961) *5*, 405.
291. O'Donnell E. H. J., Nature (1961) *191*, 1325.
292. Ono T. S., Sugimura T., Umeda M., Gann (1955) *46*, 617.
293. Ord M. G., Stocken L. A., Biochim. Biophys. Acta (1958) *29*, 201.
294. Ord M. G., Stocken L. A., Biochem. J. (1958) *68*. 410.
295. Paladini A. C., Leloir L. R., Biochem. J. (1952) *51*, 426.
296. Payne A. H., Kelly L. S., Beach G., Jones H. B., Cancer Research (1952) *12*, 426.
297. Payne A. H., Kelly L. S., White M. R., Cancer Research (1952) *12*, 65.

298. Pete-Klein N., Wintzerith M., Mandel L., Mandel P., Compt. Rend. Acad. Sci. (1964) *258*, 5283.
299. Perry R. P., Exp. Cell. Res. (1960) *20*, 216.
300. Perry R. P., Errera M., Hell A., Durwald H., J. Biophys. Biochem. Cyt. (1961) *11*, 1.
301. Philipson L., J. Gen. Phys. (1961) *44*, 899.
302. Pileri A., Ledoux L., Poznanska H., Rev. franç. études clin. et biol. (1958) *3*, 890.
303. Pogo A. O., Pogo B. G. T., Littau V. C., Allfrey V. G., Mirsky A. E., Hamilton M. G., Biochim. Biophys. Acta (1962) *55*, 849.
304. Pontis H. G., Blumson N. G., Biochim. Biophys. Acta (1958) *27*, 618.
305. Potter V. R., Elvejehm C. A., J. Biol. Chem. (1936) *114*, 495.
306. Potter R. L., Schlesinger S., Buettner-Janusch V., Thomson L., J. Biol. Chem. (1957) *226*, 381.
307. Prescott D. M., Bender M. A., Exp. Cell. Res. (1962) *25*, 260.
308. Prescott D. M., Exp. Cell. Res. (1960) *19*, 29.
309. Prescott D. M., Ann. Rev. Physiol. (1960) *22*, 17.
310. Price J. M., Miller J. A., Miller E. C., Weber G. M., Cancer Research (1949) *9*, 96.
311. Purvis J. L., Biochim. Biophys. Acta (1960) *38*, 435.
312. Quastel J. H., Zatmann L. J., Biochim. Biophys. Acta (1953) *10*, 256.
312a. Quirin C., Jacob M., Mandel P., Compt. Rend. Acad. Sci. (1964) *258*, 6013.
313. Reddy D. V. N., Cerecedo L. R., Fed. Proc. (1951) *10*, 236.
314. Reddy D. V. N., Breiger H., Orchen M., Cancer Research (1957) *17*, 677.
315. Redetzki H. M., O'Bourke F. A., Schneider M., Biochem. Pharm. (1961) *8*, 335.
316. Rees K. R., Rowland G. F., Varcoe J. S., Biochem. J. (1963) *86*, 130.
317. Reid E., Stevens B. M., Biochem. J. (1957) *67*, 262.
318. Revel M., Mandel L., Wintzerith M., Klein N., Mandel P., Bull. Soc. Chim. Biol. (1961) *43*, 91.
319. Revel M., Thèse de doctorat ès Sciences Université de Strasbourg (1963) 105 pages imprimées.
320. Rho J. H., Bonner J., Proc. Nat. Acad. Sci. (1961), *47*, 1611.
321. Ricci C., Ivaldi G., Bull. Soc. Chim. Biol. (1958), *40*, 1163.
322. Rodesch J., Thèse de doctorat d'université Strasbourg (1961), 184 pages dactylographiées.
323. Rosenberg R., Thèse d'ingénieur-docteur Strasbourg (1959), 155 pages dactylographiées.
324. Rotherham J., Schneider W. C., J. Biol. Chem. (1958) *232*, 853.
325. Sacks J., Arch. Bioch. (1951) *30*, 423.
326. Sahasrabudhe M. E., Nature (1958) *182*, 163.
327. Saukkonen J. J., Ann. Med. Exp. et Biol. Fenniae (1956) *34*, Supp. *3*, 78.
328. Scherer E., Ringleb D., Ventske L. E., Strahlentherapie (1953) *90*, 41.
329. Scherrer K., Darnell J. E., Biochem. Biophys. Res. Comm. (1962) *7*, 486.
330. Schildkraut C. L., Marmur J., Doty P., J. Mol. Biol. (1961) *3*, 595.
331. Schildkraut C. L., Marmur J., Fresco J. R., Doty P., J. Biol. Chem. (1961) 236 PC 2.
332. Schmidt G., Thannhauser S. J., J. Biol. Chem. (1945) *161*, 83.
333. Schmitz H., Naturwissenschaften (1954) *41*, 120.
334. Schmitz H., Biochim. Biophys. Acta (1954) *14*, 160.
335. Schmitz H., Hurlbert R. B., Potter V. R., J. Biol. Chem. (1954) 209, 41.
336. Schmitz H., Potter V. R., Hurlbert R. B., White D. M., Cancer Research (1954) *14*, 66.
337. Schmitz H., Hart W., Ried H., Z. Krebsforsch. (1955) *60*, 301.

338. Schmitz H., Potter V. R., Hurlbert R. B., Z. Krebsforsch. (1955) *60*, 419.
339. Schmitz H., 11 Coll. der Gesell. Physiol., April 1960, Chem. Mosbach, Baden, Springer-Verlag (1961), 1.
340. Schneider J. H., J. Biol. Chem. (1959) *234*, 2728.
341. Schneider J. H., Biochim. Biophys. Acta (1961) *47*, 107.
342. Schneider W. C., Cancer Research (1945) *5*, 717.
343. Schneider W. C., Cancer Research (1946) *6*, 691.
344. Schneider W. C., J. Biol. Chem. (1955) *216*, 287.
345. Schnitger H., Papenberg K., Ganse E., Czok R., Bücher Th., Adam H., Biochem. Z. (1959) *332*, 167.
346. Scholtissek C., Biochem. Z. (1960) *332*, 458 et 467.
347. Scholtissek C., Potter V. R., Z. Naturforschung (1960), *15b*, 452.
348. Scholtissek C., Nature (1962) *194*, 353.
349. Schulman H. M., Bonner D. M., Proc. Nat. Acad. Sci. (1962) *48*, 53.
350. Schuster L., Langan T. A., Kaplan N. O., Goldin A., Nature (1958) *182*, 512.
351. Scott J. F., Kaltreider H. B., Boeker F. A., Taft E. B., Fed. Proc. (1964) *23*, N° 405.
352. Sensenbrenner M., Thèse de doctorat ès-Sciences Strasbourg (1962), 109 pages imprimées.
353. Sibatani A., Yamana K., Kimura K., Takahashi T., Nature (1960) *186*, 215.
354. Sibatani A., de Kloet S. R., Allfrey V. G., Mirsky A. E., Proc. Nat. Acad. Sci. (1962) *48*, 471.
355. Siekevitz P., Van Potter R., J. Biol. Chem. (1955) *215*, 221.
355. Siekevitz P., Van Potter R., J. Biol. Chem. (1955) *215*, 237.
357. Silverstone H., Tannenbaum A., Cancer Research (1951) *11*, 442.
358. Singer B., Fraenkel-Conrat H., Virology (1961) *14*, 59.
359. Sirlin J. L., Nature (1960) *186*, 275.
360. Sirlin J. L., Jacob J., Nature (1962) *195*, 114.
361. Sirlin J. L., Jacob J., Kato K. I., Exp. Cell. Res. (1962) *27*, 355.
362. Smellie R. M. S., Dans Nucleic Acids (Chargaff E., Davidson J. N.), Acad. Press New-York (1955) *2*, 393.
363. Smetana K., Busch H., Cancer Research (1964) *24*, 537.
364. Spiegelmann S., Coll. intern. du CNRS — Acides Ribonucléiques et polyphosphates — Strasbourg Juillet 1961 — Editions du CNRS — p. 407.
365. Spiegelmann S., Scient. American (1964) *210*, 48.
365a. Spiegelmann S., Hall B. D., Storck R., Proc. Acad. Sci. (1961) *47*, 1135.
366. Sporn M. B., Dingman W., Biochim. Biophys. Acta (1963) *68*, 387.
367. Srinivasan P. R., Biochim. Biophys. Acta (1962) *61*, 526.
368. Sripati G., Sfafarz D., Khouvine Y., Compt. Rend. Acad. Sci. (1962) *254*, 1344.
369. Stenram U., Acta Path. Microbio. Scand. (1958) *44*, ~~329~~. 239
370. Stitch H., Z. Naturforschung (1951) *6b*, 319.
371. Stowell R. E., Arch. Pathol. (1948) *46*, 164.
372. Sure B., Theis R. M., Harrelson R. T., Am. J. Cancer (1936) *36*, 252.
373. Symington T., Currie A. R., Curran R. C., Davidson J. N., Ciba Foundation, Colloquia on Endocrinology (1955) *8*, 70.
374. Takahashi T., Nagahata K., Oda T., Suzuku H., Ishii K., Tominaga H., Yamanaka M., Sogo Igaku (1955) *12*, 395.
375. Takahashi T., Swint R. B., Hurlbert R. B., Exp. Cell. Res. (1963) *9*, 330.
376. Tannenbaum A., Silverstone H., Cancer Research (1949) *9*, 162.
377. Tatarskit V. V., Voprosy Onkologii (1955) *1*, 101.
378. Terroine E. F., Bull. Soc. Chim. Biol. (1936) *18*, 656.
379. Thomson R. Y., Heagy F. C., Hutchison W. C., Davidson J. N., Biochem. J. (1953) *53*, 460.

380. Totter J. R., Volkin E., Carter C. E., J. Am. Chem. Soc. (1951) *73*, 1521.
381. Tsuboi K. K., Price T. D., Arch. Biochem. Biophys. (1956) *81*, 223.
382. Tyner E. P., Heidelberger C., Le Page G. A., Cancer Research (1952) *12*, 158.
383. Tyner E. P., Heidelberger C., Le Page G. A., Cancer Research (1953) *13*, 186.
384. Vessereau A., Que sais-je? Presse Universitaire de France - La statistique.
385. Vincent W. S., Int. Rev. Cyt. (1955) *4*, 269.
386. Volkin E., Carter C. E., J. Am. Chem. Soc. (1951) *73*, 1516.
387. Volkin E., Cohn W. E., Methods of Biochemical Analysis Inter. Science New-York (1954) *1*, 304.
388. Waravdekar V. S., Powers O. H., Leiter J., Proc. Am. Ass. Cancer Research (1956) *2*, 155.
389. Waravdekar V. S., Powers O. H., Proc. Exp. Biol. Med. (1956) *92*, 797.
390. Warburg O., The Metabolism of Tumours (Constable London) (1930).
391. Warburg O., Science (1956) *123*, 309.
392. Way J. L., Mandel H. G., Smith P. K., Cancer Research (1954) *14*, 812.
393. Werkheiser W. C., Winzler R. J., J. Biol. Chem. (1953) *204*, 971.
394. Weill J. D., Thèse de doctorat ès-sciences Strasbourg (1958), 176 pages dactylographiées.
395. Weinhouse S., Advances in Cancer Research New-York Acad. Press. Inc. (1955) *3*, 269.
396. Weiss S. B., Gladstone L., J. Am. Chem. Soc. (1959) *81*, 4118.
397. Weiss S. B., Proc. Nat. Acad. Sci. (1960) *46*, 1020.
398. Wenner C. E., Weinhouse S., Cancer Research (1953) *13*, 2.
399. White F. R., Belkin M., J. Nat. Cancer Inst. (1945) *5*, 261.
400. White J., White F. R., Mider G. B., J. Nat. Cancer Inst. (1947) *7*, 199.
401. Wieland Th., Pfleiderer G., Angewandte Chemie (1955) *67*, 257.
402. Winckelmans D., Hill M., Errera M., Biochim. Biophys. Acta (1964) *80*, 52.
403. Wollenberger A., Klause E. G., Wahler B. E., Naturwissenschaften (1958) *45*, 294.
404. Yamana K., Sibatani A., Biochim. Biophys. Acta (1960) *41*, 295.
405. Yankofsky S. A., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci. (1962) *48*, 1069.
406. Yankofsky S. A., Spiegelman S., Proc. Nat. Acad. Sci. (1962) *48*, 1466.
407. Yeakel E. H., Cancer Research (1948) *8*, 392.
408. Zadek J., Acta Med. Scandinav. (1933) *80*, 78.
409. Zajdela F., Morin G. A., Revue Hémat. (1952) *7*, 628.
410. Zajdela F., Communication personnelle.
411. Zalta J. P., Thèse de doctorat d'Etat, Faculté de Sciences Paris (1961), 164 pages imprimées.
412. Zalta J. P., Rozencwajg R., Carasso N., Favard P., Comt. Rend. Acad. Sci. (1962) *255*, 412.
413. Zbarsky S. H., Hori A., Findllay B. S., Can. J. Biochem. Physiol. (1958) *36*, 1185.

Propositions données par la Faculté
ou, éventuellement, seconde Thèse:

LA MÉLATONINE ET LA SÉROTONINE
CHEZ LES ÊTRES VIVANTS

Strasbourg, le 14 décembre 1964

Le Président de la Thèse:
J. VIVIEN

VU
Strasbourg, le 14 décembre 1964

Le DOYEN,
Pour le Doyen,
L'Assesseur,
J. BRENET

Vu et permis d'imprimer
Strasbourg, le 14 décembre 1964

Le RECTEUR de l'Académie de Strasbourg
Président du Conseil de l'Université
M. BAYEN

ACHEVÉ D'IMPRIMER
SUR LES PRESSES DE
L'IMPRIMERIE SICOP
67, Avenue de Périgueux
BISCHHEIM (BAS-RHIN)
JANVIER 1965

DÉPOT LÉGAL 1er TRIMESTRE 1965